Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen über den Nucleinsäure-Stoffwechsel in embryonalem Säugetiergewebe in-vivo und in-vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ralf Krowke
aus Berlin

1970

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546510_0007

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen über den Nucleinsäure-Stoffwechsel in embryonalem Säugetiergewebe in-vivo und in-vitro

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ralf Krowke
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. D. Neubert

Korreferent: Prof. Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 197o

Tag der Promotion: 27. JULI 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhalt

A. Einleitung 1

B. Methoden

a) Vorbereitung der Tierversuche 3

b) Durchführung der Markierungsversuche

α) Markierung in vivo 4

β) Markierung in vitro 5

c) Bestimmung der Radioaktivität in verschiedenen Zellkomponenten

α) Fraktionierte Säuren-Laugen-Extraktion 7

β) Extraktion der Nucleinsäuren mit der Phenol-Methode 12

γ) Prinzipien der Auftrennung der RNA in verschiedenen Komponenten 18

δ) Auftrennung der RNA-Komponenten im Saccharose-Gradienten 19

ε) Alkalische Hydrolyse der RNA und Trennung der Mononucleotide 22

ζ) Saure Hydrolyse der RNA und Trennung der Basen 24

η) Messung der Absorptionsspektren und quantitative Bestimmung der Nukleotide und Basen 25

θ) Messung der Radioaktivität einschließlich Messung der Doppelmarkierung P^{32} - C^{14} 26

C. Ergebnisse, Diskussion

a) Versuche über den Einbau verschiedener radioaktiver Vorstufen in Zellbestandteile von Leber und Embryo in vivo 29

α) Einbau von Orotsäure 30

β) Einbau von Uracil und Uridin 30

γ) Einbau von Formiat 31

δ) Einbau von Asparaginsäure und Glycin 31

ε) Einbau von Bicarbonat in die RNA 32

ζ) Einbau von Glucose 32

η) Einbau von P^{32} 33

Zusammenfassung von C. a) und Diskussion 34

C. b) Ermittlung der Gesamtradioaktivität, die vom Muttertier auf den Embryo übergegangen ist (Beurteilung der Barriere zwischen Mutter und Embryo 42
c) Verteilung der Radioaktivität auf säurelösliche und säureunlösliche Fraktionen 47
d) Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Komponenten der säureunlöslichen Fraktionen 49
e) Versuche über den Einbau verschiedener radioaktiver Vorstufen in-vitro 51
f) Versuche über den Einbau verschiedener radioaktiv markierter Vorstufen in ribosomale RNA in vivo 52
g) Versuche über den Einbau von C^{14}-Glucose in ribosomale RNA in vivo 55
α) Zeitliche Abhängigkeit des Einbaues nach der Injektion 55
β) Einbau von C^{14}-Glucose in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung 56
γ) Einbau in die verschiedenen Mononucleotide der RNA 57
δ) Einbau von C^{14}-Glucose in die verschiedenen Basen der RNA 60
h) Versuche über den Einbau von P^{32} in ribosomale RNA in vivo 63
i) Doppelmarkierungsversuche mit C^{14}-Glucose und P^{32} in vivo 64
k) Versuche über den Einbau von verschiedenen Precursoren in vitro unter besonderer Berücksichtigung von P^{32} und C^{14}-Glucose 66
α) Einbau von Orotsäure 67
β) Einbau von Formiat 67
γ) Morphologie der Embryonen nach Inkubation in Serum und elektrolyt-haltigem Medium 67
δ) Einbau von P^{32} 69
ε) Einbau von C^{14}-Glucose (Säure-Laugen-Fraktionierung) 70
ζ) Einbau von C^{14}-Glucose (Phenolmethode) 71
η) Langzeit-in-vitro-Inkubationen mit der Trowel-Kultur 73
l) Schlußfolgerungen 75
D. Zusammenfassung 78

A. Einleitung

Von allen Säugetiergeweben zeigt embryonales Gewebe zweifellos die höchste Wachstumsrate. In bestimmten Stadien der embryonalen Entwicklung - nämlich während der Organdetermination und der Differenzierung - muß darüberhinaus eine große Zahl von Induktionsvorgängen ablaufen, damit die Zellen, denen später eine bestimmte Funktion in den verschiedenen Organen zugeordnet werden soll, die entsprechende Fermentausstattung erhalten. Da Wachstums- und Differenzierungsvorgänge eng mit derartigen Vorgängen im Nucleinsäurestoffwechsel gekoppelt sind, ist es von großem theoretischen und auch praktischen Interesse, mehr über den Nucleinsäurestoffwechsel im embryonalen Säugetiergewebe während der Differenzierungsphase zu erfahren.

Von einer großen Zahl heute bekannter embryotoxischer Verbindungen muß angenommen werden, daß sie in Vorgänge der Nucleinsäure- oder Proteinsynthese eingreifen. So ist es wichtig, über Methoden zu verfügen, mit denen der Einfluß von Pharmaka auf den Nucleinsäurestoffwechsel embryonaler Zellen untersucht werden kann. Dabei ist es wünschenswert, sowohl Untersuchungen in vitro als auch in vivo anstellen zu können. Da bisher biochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel embryonalen Säugetiergewebes kaum unternommen wurden, müssen Methoden entwickelt werden, die es gestatten, solche biochemisch-pharmakologischen Untersuchungen durchzuführen.

Es war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, Methoden zu erarbeiten, die es ermöglichen, sowohl in-vivo als auch in-vitro Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel embryonalen Gewebes unter dem Einfluß von Pharmaka durchzuführen. Da die Verfolgung von Stoffwechselvorgängen unter dem Einfluß von Pharmaka in vivo besonders interessant erscheint,wurde der Schwerpunkt auf die Entwicklung von Methoden gelegt, die Aussagen über den Nucleinsäurestoffwechsel in vivo zulassen.

Zweckmäßigerweise erfolgt eine Stoffwechseluntersuchung in vivo mit Hilfe radioaktiv markierter Vorstufen und einer anschließenden Analyse von Zellbausteinen. Solche Untersuchungen sind jedoch dadurch kompliziert, daß eine Reihe sonst in der Biochemie gebräuchlicher Vorstufen nur schlecht auf den Embryo übergehen. Im ersten Teil der Arbeit wird daher über Untersuchungen berichtet, die klären sollten, welche radioaktiv markierten Verbindungen als Vorstufen für Stoffwechseluntersuchungen in vivo in Frage kommen.

Es wurden sodann Methoden zum Nachweis der Radioaktivität in verschiedenen Nucleinsäurekomponenten des embryonalen Gewebes erarbeitet. Hierzu mußten Methoden der Zellfraktionierung, der Isolierung von RNA-Komponenten und der Analyse der einzelnen Nucleinsäure-Bausteine auf die Besonderheiten des embryonalen Gewebes angepaßt werden.

Um einen Einblick in den Nucleinsäurestoffwechsel des embryonalen Säugetiergewebes während der Differenzierungsphase zu erhalten, wurden an Rattenembryonen an den Tagen 11 bis 14 der Schwangerschaft systematische Untersuchungen über den Einbau verschiedener radioaktiv markierter Vorstufen in die verschiedenen Nucleinsäurekomponenten durchgeführt.

Bei den in-vivo-Experimenten erhielten die Muttertiere die radioaktiven Vorstufen intravenös appliziert. Diese Versuche wurden durch Experimente ergänzt, bei denen die intakten Embryonen in-vitro mit den entsprechenden radioaktiven Vorstufen inkubiert wurden.

B) Methoden

a) Vorbereitung der Tierversuche

Für die Versuche wurden WISTAR-Ratten der Stämme SW 64 und SW 68 benutzt. Als Futter wurde ALTROMIN ^{R} verwandt. Die Tiere hatten unbeschränkten Zugang zu Leitungswasser. Die Raumtemperatur betrug 25 ^{o} C., die Luftfeuchtigkeit 50 bis 60 %.

Will man Stoffwechseluntersuchungen an 11 bis 14 Tage alten Rattenembryonen durchführen, so ist es unerläßlich, das genaue Alter der Embryonen zu kennen. Der Zyklus von Ratten hat eine Länge von 3 bis 4 Tagen. Die Ovulation erfolgt normalerweise mit großer Regelmäßigkeit nachts, kurz nach Mitternacht. Die hormonale Steuerung erfolgt offenbar durch Licht. Der Ovulationstermin kann durch Dauerbelichtung verschoben bzw. ganz unterdrückt werden. Für ein genaues "timing" wurden die Tiere in allen unseren Versuchen zur Paarung nur für einen Zeitraum von zwei Stunden zusammengesetzt. Hierzu wurden jeweils drei Weibchen in den Macrolonkäfig eines Männchens gegeben. Um die Zeit der Ovulation in die Arbeitszeit zu legen, wurden die Tiere bei einem veränderten Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie hatten unter unseren Versuchsbedingungen von 12 Uhr MZ bis 4 Uhr MZ, d. h. also über einen Zeitraum von 16 Stunden, Licht. Ein zweiter Vorteil dieser Veränderung besteht darin, daß man unabhängig von jahreszeitlich bedingten Schwankungen in der Dauer von Tag und Nacht ist. Neugelieferte Tiere wurden mindestens 14 Tage lang diesem neuen Rhythmus angepaßt. 4 Stunden vor Ende der Dunkelperiode, also um 8 Uhr MZ, wurden die Tiere zusammengesetzt und 2 Stunden später wieder getrennt. Die weiblichen Tiere lassen sich nur begatten, wenn sie zyklusgerecht sind. Durch Vaginalabstriche läßt sich feststellen, ob ein Koitus stattgefunden hat, d. h. ob Spermien im Ausstrich sichtbar sind. Beim Nachweis auch nur eines Spermiums ist damit zu rechnen, daß eine Befruchtung stattfinden wird. Nach dieser Methode ist es also möglich, den Konzeptionszeitpunkt auf wenige Stunden genau festzulegen. Die Schwangerschaftsrate betrug bei diesem Vorgehen etwa 80 bis 90 %.

Die Charakterisierung des Schwangerschaftstermines erfolgte so, daß die 24-Stunden-Periode vom Auffinden der Spermien bis 9 Uhr des folgenden Tages als Tag 0 bezeichnet wurde.

b) Durchführung der Markierungsversuche

α) Markierung in vivo

Die Applikation sämtlicher Substanzen erfolgte durch intravenöse Injektionen. Zweckmäßigerweise bedient man sich dabei der Injektion in die Schwanzvene. Es ist unbedingt darauf zu achten, daß die Substanzen wirklich intravenös injiziert werden. Dies ist besonders bei Verwendung kleinerer Volumina - beispielsweise unter 0,5 ml - nur schwer zu erkennen. Um die Vene gut sichtbar zu machen und dadurch eine Injektion zu erleichtern, wurde der Schwanz in Wasser von ungefähr 45 ^{o} eingetaucht. Das Injektionsvolumen betrug 1 ml/200 g Tier. Diese Menge ist groß genug, um eine paravenöse Applikation zu erkennen. Die einzelnen Substanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung von pH 7,o bis 7,5 gelöst. Die quantitative Auflösung der Substanz erfolgte durch Kontrolle der Radioaktivität.

Bei den Doppelmarkierungsversuchen erfolgte nur eine Injektion. Die beiden radioaktiv markierten Substanzen, nämlich P ^{32} und C ^{14}-Glucose, wurden vor dem Versuch in entsprechendem Verhältnis gemischt. Je nach Versuchsbedingungen wurden Tiere 0,5 bis 10 Stunden nach Applikation der markierten Substanz durch Dekapitation getötet und die Embryonen sorgfältig herauspräpariert. Besonders bei den 11 Tage alten Embryonen bereitete dies einige Schwierigkeit, da die Keime in diesem Zustand noch sehr klein sind und feucht nur etwa 1 mg wiegen. Falls eine Auftrennung in verschiedene Zellfraktionen geplant war, erfolgte die Zerkleinerung der Gewebe durch Homogenisation in einem Glashomogenisator mit Teflonpistill der Firma Braun/Melsungen von geeigneter Größe (5 bis 10 ml) mit einem Rührmotor der Firma Jahn & Kunkel/Stauffen. Die Umdrehungsgeschwindigkeit betrug in der Regel 1000 Umdrehungen/Minute, die Homogenisationsdauer etwa 45 Sekunden. Das Homogenisationsmedium bestand aus 0,32 molarer Saccharose-Lösung von pH 7,5 10 mM Tris, 3 mM $MgCl_2$. Um für die späteren Extraktionen etwa gleiche Bedingungen hinsichtlich der Konzentration an biologischem Material zu haben, legten wir für Embryonen folgende Bedingungen fest: Pro 13-Tage alten Embryo gaben wir 1 ml Saccharose-Lösung, pro sieben 11-Tage-Embryonen bzw. pro vier 12-Tage-Embryonen je 1 ml Saccharose, je einen 14-Tage-Embryo/2 ml Saccharose. In 10 ml Saccharoselösung wurde etwa 1 g Lebergewebe homogenisiert. In den meisten Fällen wurde mit diesem Homogenat weitergearbeitet und daraus die verschiedenen Zellkomponenten nach geeigneten Verfahren und Methoden isoliert.

β) Markierung in vitro

Da die Placenta eine Barriere für viele Substanzen darstellt und das Angebot der intravenös zugeführten Substrate an den embryonalen Zellen hierdurch in vielen Fällen limitiert ist, haben wir nach einer Versuchsanordnung gesucht, die es gestattet, diese Barriere auszuschalten. Es wurde ein in-vitro-System entwickelt, das es erlaubt, den Einfluß von Pharmaka auf Stoffwechselreaktionen - besonders Reaktionen des Nucleinsäurestoffwechsels - zu untersuchen. Die Anordnung sollte es ermöglichen, solche Reaktionen über einen Zeitraum von mehreren Stunden zu verfolgen.

In den mit + bezeichneten Versuchsreihen kam es zunächst darauf an zu sehen, ob die Substanzen rasch in ausreichender Menge auf den Embryo übergehen. Langzeitversuche, die sich über mehrere Stunden hinziehen, sollten in diesem Zusammenhang aber nicht durchgeführt werden. Die Embryonen wurden daher in einer etwas modifizierten Krebs-Ringer-Lösung bei 37 ° inkubiert. Die Lösung bestand aus folgenden Teilen: 140 mM NaCl, 4,9 mM KCl, 1,2 mM MgCl, 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5. Die Inkubationsdauer betrug für diese Versuche jeweils 15 Minuten. Die radioaktiv markierten Verbindungen wurden in einer Menge von 20 µCi/ml zugesetzt. Pro Ansatz (2 ml) wurden vier 13 Tage alte Embryonen verwendet.

Zusätzlich zu den oben angeführten Versuchen, bei denen es uns nur darauf ankam, zu sehen, ob die markierten Substrate auf den Embryo übergehen und ob die Markierung in den einzelnen Zellkomponenten wesentlich höher liegt als bei entsprechenden in-vivo-Versuchen, haben wir mit P^{32} und C^{14}-Glucose in-vitro-Untersuchungen durchgeführt, die sich über einen Zeitraum von 3 Stunden und mehr erstreckten. Da zu erwarten ist, daß bei so lange dauernden Inkubationen in einem nur elektrolythaltigen Medium ein Schädigungsstoffwechsel gemessen wird, wurde für diese Untersuchungen ein Medium verwendet, das Rattenserum enthielt. Zur Entfernung störender kleinmolekularer Substanzen und Substrate wurde das Serum über Nacht in einem Schnelldialysator gegen die oben angegebene Krebs-Ringer-Lösung dialysiert.

Für die Versuche, die über mehr als 15 Minuten liefen, wurde als Substrat 0,1 % Glucose zugesetzt. Bei den C^{14}-Glucose-Versuchen betrug die Aktivität 50 µCi/ml, bei P^{32} 150 µCi/ml.

Bei den Versuchen mit der Trowel-Kultur über 11 und 25 Stunden wurden 11 Tage alte Embryonen verwendet, die jeweils die letzten 3 Stunden in neues Nährmedium umgebettet wurden, das 100 µCi/ml aktive Glucose enthielt, aber nur 0,05 % inaktive, also eine spezifische Aktivität von 30 µCi/µMol.

Die Untersuchungen mit der Trowel-Kultur konnten wegen den erforderlichen, möglichst absolut sterilen Bedingungen in unserem Labor nicht durchgeführt werden. Sie wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Professor MERKER ausgeführt.

c) Bestimmung der Radioaktivität in verschiedenen Zellkomponenten

α) Fraktionierte Säuren/Laugen-Extraktion

Seit ungefähr 8 Jahren sind in diesem Labor Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel in Mitochondrien und Zellkernfraktionen (hochgereinigt) durchgeführt worden mit Hilfe einer etwas modifizierten Methode, die von OGUR und ROSEN (74) entwickelt worden ist. Diese Methode eignet sich besonders gut für die Erfassung sehr kleiner Mengen von Nucleinsäuren. Sie ist ursprünglich für Pflanzenmaterial angegeben worden. Das Prinzip dieser Extraktion beruht darauf, RNA durch eine kalte Perchlorsäure-Extraktion von DNA zu trennen. Die DNA wird dann anschließend mit heißer Perchlorsäure (PCS) partiell hydrolisiert und extrahiert. Dabei wird so vorgegangen, daß zuerst Proteine und Nucleinsäuren mit eiskalter PCS (0,2 n) ausgefällt werden. Unter laufender weiterer Kühlung werden die Sedimente mehrfach "gewaschen", d. h. in einer Kühlzentrifuge sedimentiert, anschließend in frischer, kalter PCS resuspendiert usw. Auf diese Weise werden säurelösliche Substanzen - besonders auch Nucleotide - entfernt. Die säureunlösliche Fraktion wird mit 1 n, d. h. 6%-iger PCS, 18 Stunden bei 1 ^{o} extrahiert. Lipide werden danach durch mehrfache Extraktion mit organischen Lösungsmitteln entfernt (3 x Äther/Alkohol, Benzol, Äther). Aus dem Rückstand wird dann durch eine zweimalige, 15-minütige Extraktion bei 75 ^{o} die DNA in Lösung gebracht. Danach soll im Rückstand nur Protein verbleiben, das von sämtlichen Nucleinsäuren befreit ist. In den einzelnen Fraktionen kann die Radioaktivität - wie weiter unten angegeben - leicht gemessen werden. Die Bestimmung von RNA, DNA und Protein erfolgt mit Hilfe weiter unten genannter Methoden.

Dieses Verfahren eignet sich vor allem - wie oben schon kurz erwähnt wurde - für die Bestimmung von Nucleinsäuren aus hochgereinigten Zellkernen und Mitochondrien. Es hat sich aber in unserem Labor herausgestellt, daß diese Methode für die quantitative Bestimmung und Extraktion von RNA aus Embryonen ungeeignet ist, da eine quantitative Extraktion der RNA unter diesen Bedingungen nicht erfolgt. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen, die MOULÉ (70) bei Verwendung von Hühnerleberextrakten gewonnen hat. Er berichtet, daß er unter diesen Bedingungen nur 64 % der gesamten RNA extrahiert. Bei Erhöhung der Extraktionsdauer auf 36 Stunden wurden 78 % extrahiert. Die nicht extrahierte RNA wird in der DNA-Fraktion durch die heiße PCS-Extraktion erhalten. Auch andere Autoren wie DEKEN-GRENSON (25), STANSLEY und CHU (97) erhalten bei cytoplasmatischer RNA-Extraktion bzw. DNA-Extraktion ähnliche Ergebnisse. Nach SOLOMON (96) und STEINERT (98) erwies sich die Ogur-Rosen-Methode für die Extraktion embryonaler RNA von Vögeln als unzureichend. Dies entspricht auch unserer Erfahrung mit Säugetiergeweben. Die Schwierigkeit beruht nach unseren Ergebnissen ganz offenbar darauf, daß die RNA zwar

aus Zellkernen und Mitochondrien und auch aus dem Hyaloplasma extrahiert werden kann, daß jedoch Ribosomen-RNA unvollkommen freigesetzt wird. Um die RNA aus den embryonalen Geweben quantitativ zu extrahieren, wurde darum die OGUR-ROSEN-Methode (74) mit dem von SCHMIDT-TANNHAUSER (86) angegebenen Vorgehen kombiniert. Das Verfahren wird im folgenden als Säure-Basen-Extraktion bezeichnet. Die Routinemethode wird folgendermaßen angewandt: Nach Fällung mit PCS und mehreren "Waschungen" wird das Sediment anschließend in 0,3 n NaOH aufgelöst und bei 37 ^{o} C 60 Minuten lang inkubiert. Dadurch wird die RNA zu säurelöslichen Polynucleotiden hydrolisiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde sofort in Eis gekühlt und mit 10 %-iger PCS angesäuert. Dabei fallen die Protein- und DNA-Komponenten aus.

Nachdem die Methode in der beschriebenen Form eine Zeit lang angewandt wurde, stellte sich heraus, daß die Werte für die RNA immer dann unzuverlässig werden, wenn gleichzeitig die Lipidfraktion durch die entsprechende Vorstufe hoch markiert wird. Dies ergibt sich besonders aus den Ergebnissen der Versuche, bei denen der Einbau der Radioaktivität aus C^{14}-Glucose studiert wurde. Offenbar können nicht alle Lipide nach der Laugenbehandlung durch die anschließende Fällung aus dem Versuchsansatz entfernt werden. Dieser Anteil der Lipide gelangt dann in die RNA-Fraktion und es wird eine Radioaktivität bestimmt, die zu hoch liegt.

Dieser Fehler kann dadurch vermieden werden, daß die Lipidextraktion vor der Laugenbehandlung durchgeführt wird. Bei der endgültigen, für die Routineuntersuchungen angewandten Methode haben wir darum die Lipidextraktionen gleich im Anschluß an die Säurewaschungen durchgeführt. Die in der Tabelle *1* zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß die RNA-Menge nach wie vor quantitativ extrahiert werden kann und keine nennenswerte Menge von RNA durch die Waschungen mit organischen Lösungsmitteln verlorengeht. Die spezifische Aktivität der RNA-Fraktion nach dem Einbau radioaktiver Vorstufen (in diesem Falle C^{14}-Glucose) ist bei dieser Art der Messung jedoch wesentlich geringer.

Die Ergebnisse, die mit der endgültigen - nach unseren jetzigen Kenntnissen offenbar optimalen - Methode gewonnen wurden, sind in den Tabellen mit einem * bezeichnet worden. Die mit der ursprünglichen Methode erhaltenen RNA-Werte können dann zu hoch liegen, wenn die Lipidfraktion gleichzeitig hoch markiert ist. Da es uns nur darauf ankam, mit der Säure-Basen-Extraktion einen relativ groben Überblick über die Verteilung der Radioaktivität zu erhalten, ist dieser Mangel in der Methodik wohl nicht allzu schwerwiegend. Die RNA wurde zudem in jedem Fall unabhängig davon nach der Phenolmethode hoch gereinigt, so daß die

Tabelle 1

	letzte Säure dpm	Σ lpm/µg DNA	DNA lpm/µg DNA	lpm RNA/µg RNA	Σ Lipidextraktion µg DNA	µg RNA
I	41,1	313	22,9	66,8	93,3	508
II	72,1	302	23,4	59,6	99,4	585
III	62,1	293	24,8	20,5	211,2	589
IV	42,7	259	22,5	19,1	203,2	508

Die Tabelle zeigt einen Vergleich der spezifischen Aktivität in der RNA und in Lipiden nach verschiedener Reihenfolge der einzelnen Extraktionen nach Markierung von embryonalem Gewebe (13 Tage-Embryonen) in vitro mit C^{14}-Glucose; in den Versuchen I und II wurde die RNA vor den Lipiden extrahiert, bei III und IV nach den Lipiden. Es ist ersichtlich, daß bei Verwendung eines Precursors, der neben der RNA auch die Lipidfraktionen hoch markiert, die Lipide vor der Extraktion der RNA entfernt werden müssen, da anderenfalls die spezifische Aktivität in der RNA-Fraktion zu hoch ausfällt. Der RNA-Gehalt selbst ist ziemlich konstant, d.h. die RNA ist nicht oder nur zu einem geringen Prozentsatz in der Lipidfraktion zu finden, wenn diese vor der RNA extrahiert wird. Wir haben daher die letzten Versuchsreihen routinemäßig so durchgeführt, daß die Lipide vor der RNA extrahiert wurden. Es muß aber erwähnt werden, daß es sich bei obiger Versuchsreihe um einen besonders extremen Fall handelt.

spezifische Aktivität in der RNA aus diesen Experimenten bekannt ist. Das Sediment wird zur Entfernung der Lipide dreimal mit Aether-Alkohol (1+3), einmal mit Benzol und einmal mit Aether gewaschen. Die DNA wird dann bei 75 ° - wie oben angegeben - sauer hydrolisiert. Die Abbildung 1 zeigt die Methode im Schema.

In den mit * bezeichneten Versuchsreihen erfolgte die Lipidextraktion vor der alkalischen Hydrolyse, da ein nicht unbeträchtlicher Teil der Radioaktivität in der RNA-Fraktion aus der Lipid-Fraktion stammt. Damit ist die spezifische Aktivität der RNA - besonders bei der Verwendung von Praecursoren, die (wie Glucose) bevorzugt auch in Lipide eingebaut werden - zu hoch. Der RNA-Gehalt bleibt nahezu konstant. Ein besonders extremer Fall liegt bei der in-vitro Versuchsanordnung mit C^{14}-Glucose vor:

1.) RNA-Extraktion vor der Lipidextraktion 64 cpm/µg RNA
2.) RNA-Extraktion nach der Lipidextraktion 25 cpm/µg RNA

DNA ist im Gegensatz zur RNA gegenüber einer Hydrolyse mit 0,3 n Lauge stabil. Durch Bildung sogenannter Apurinsäuren, das sind Nucleinsäuren, die keine Purinbasen mehr enthalten, könnte die DNA aber in ihrer Struktur zumindest zu einem geringen Prozentsatz so verändert worden sein, daß - mindestens ein kleiner Teil - bei der anschließenden Ansäuerung mit PCS nicht mehr quantitativ gefällt wird und somit in der RNA-Fraktion erscheint. Um zu prüfen, wie hoch der Prozentsatz der Verunreinigung der RNA-Fraktion durch DNA ist, wurde DNA in vivo mit radioaktivem Thymidin markiert und das Gewebe nach der beschriebenen Methode aufgearbeitet.

Mit der von uns benutzten DNA-Bestimmung (BURTON-Methode, [14]) war DNA in der RNA-Fraktion nicht nachweisbar. Jedoch ist diese Methode nicht allzu empfindlich. Da nach der alkalischen Hydrolyse bei 37 ° darauf geachtet wird, daß vor der Fällung mit PCS auf 0 ° C abgekühlt wird, ist die Chance zur Bildung von Apurinsäuren aus der DNA relativ gering. Proteine sind zwar gegenüber alkalischer Hydrolyse nicht vollständig resistent, unter den angegebenen Bedingungen jedoch ist es unwahrscheinlich, daß nennenswerte Mengen an Protein in der RNA-Fraktion auftauchen. Dies ist von mehreren Autoren bestätigt worden. So geben HUTCHINSON und MUNROE (40) in einem Übersichtsartikel an, daß die alkalische Hydrolyse von Proteinen unter den oben angegebenen Bedingungen zu vernachlässigen sei.

Schema zur Untersuchung des Einbaus von radioaktiv markierten Vorstufen in die Zellkomponenten.

I) Ogur-Rosen/ Schmidt-Tannhauser-Verfahren (=Säure-Laugen-Extraktion)

a) säurelösliche Fraktion
b) Lipide
c) RNA
d) DNA
e) Protein

II) Phenolextraktion

RNA

DNA

Gradientenzentrifugation

28 S

18 S

4 S

hochmolekulare RNA

ribosomale RNA

t-RNA

III) Blut

Hydrolyse

alkalisch

Mononucleotide

sauer

Basen

Hochspannungselektrophorese

AMP	A
CMP	C
GMP	G
UMP	U

Trotzdem ist bei Anwendung dieser Methode zu bedenken, daß eine geringe Verunreinigung durch Proteine in der säurelöslichen RNA-Fraktion zu hohe Werte in der spezifischen Aktivität für RNA vortäuschen kann. Dies muß bei Verwendung von radioaktiv markierten Praecursoren beachtet werden, die sowohl in RNA als auch in Proteine eingebaut werden, wie es beispielsweise für Glucose der Fall ist. Der Fehler wird immer dann von Bedeutung sein können, wenn die Protein-Fraktion sehr viel höher radioaktiv markiert ist, als die RNA-Komponenten. Wir haben diesen Unsicherheitsfaktor dadurch ausschließen können, daß wir die RNA prinzipiell auch isoliert und hochgereinigt haben, so daß die Versuchsergebnisse durch zwei unabhängige Methoden gesichert sind. Die Verunreinigung der DNA-Fraktion mit RNA ist dagegen praktisch zu vernachlässigen. So geben mehrere Autoren an, daß sie weniger als 1 bis 2 % der gesamten RNA in der DNA-Fraktion finden (SMILLIE und KROTKOV, 94; TYNER et al., 102; MARSHAK und MARSHAK, 63). Dies entspricht auch unseren Ergebnissen. Da es uns aber bei Anwendung der Säure-Basen-Extraktion nur darauf ankommt, einen groben Überblick über die Verteilung der Radioaktivität zu erhalten, und zur Bestimmung der genauen spezifischen Aktivität immer eine hochgereinigte RNA- oder DNA-Fraktion mit Hilfe der Phenolmethode vorliegt, können diese Fehler vernachlässigt werden. Für spätere Routineuntersuchungen wird selbstverständlich die Lipidextraktion vor der alkalischen Hydrolyse erfolgen.

β) Extraktion der Nucleinsäuren mit der Phenol-Methode

Da die Isolierung der Nucleinsäuren durch Säure/Basen-Extraktion mit einer Zerstörung sowohl der RNA als auch der DNA verbunden ist, wurde zusätzlich eine Isolierung und Charakterisierung der RNA mit Hilfe der "Phenol-Methode" durchgeführt. Diese Methode geht auf Arbeiten von WESTPHAL und LÜDERITZ (105) zurück, die Lipopolysaccharide aus verschiedenen Bakterienstämmen mit Hilfe von Phenol-Wasseremulsionen bei verschiedenen Temperaturen isolierten. Unabhängig voneinander benutzten SCHRAMM und GIERER (89) sowie KIRBY (44) diese Methode zur Isolierung von Nucleinsäuren (1956). Seither ist die Phenol-Extraktion zur Isolierung von RNA mannigfaltig modifiziert worden. Viele Arbeitsgruppen haben sie auf die verschiedensten Gewebe angewandt (s.Tabelle 2). Seit der Einführung der Phenol-Methode zur Extraktion von RNA aus Warmblütergeweben ist bekannt, daß RNAsen in Gegenwart von Phenol zwar gehemmt werden, daß sie andererseits diese Extraktion jedoch in enzymatisch aktiver Form überstehen können. Dadurch kann es geschehen, daß die extrahierte RNA nach Entfernen des Phenols durch Einwirkung dieses Enzyms degradiert wird. HALL und DOTY (38) benutzen daher, um eine Degradierung der RNA durch RNAsen zu verhindern, Laurylsulfat (SDS). Die Phenolextraktion wurde bei 60 ° vorge-

nommen. BERNFIELD (3) u.a. geben als guten RNAse-Hemmstoff Polyvinylsulfat (PVS) an. Diese Substanz soll schon in sehr geringen Konzentrationen (etwa 1 µg/ml) eine ausgezeichnete, stabilisierende Wirkung auf die RNA besitzen (s. auch MÖLLER und BÖDTKER, 69). (Kaufmann 43)

Die Phenolextraktion ist eine sehr wirksame Methode, um Protein zu denaturieren bzw. in der Phenolphase zu lösen und gleichzeitig die verschiedenen RNA-Komponenten in der wässerigen Phase zu halten. Während der Phenolextraktion sind die RNAsen inaktiv. Wegen der offenbar recht schonenden Behandlung der Nucleinsäuren ist diese Methode inzwischen von vielen anderen Autoren benutzt worden. Häufig wurde das Verfahren noch durch geeignete Zusätze verbessert. Besonders KIRBY (44-47) hat sich intensiv mit der Verbesserung und Erweiterung dieser Methode befaßt. Die nachfolgende Tabelle zeigt einige Autoren, die zur Isolierung von Ribonucleinsäuren Phenollösungen verwandt haben. Diese Tabelle erhebt aber keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Methoden zur Nucleinsäure-Isolierung unter Verwendung von Phenol

Autor	Methode	Zellfraktion	Species	Verwendung
Loeb,Gelboin 1963	Phenol 0,1 % SDS pH 7,o 20 C	Kerne + Methylcholanthren	Rattenleber	Test auf m-RNA
Di Girolamo 1964	Phenol 1 % SDS 0,5 % NDS pH7,6 5 C	Kerne, Cytoplasma Mikrosomen	Rattenleber	Test auf messengerähnlichen von 18 S-RNA
Cartouzou 1965	Phenol pH 6,0 45 C u. 55 C	Kerne	Rattenleber	Test auf m-RNA
Willson, Gros 1964	Phenol 1,2 % SDS pH 7,3 4 C	ganze Zellen	Kaninchen-Reticulocyten	
Scherrer 1963	Phenol 0,5 % SDS pH 5,1 60 C	ganze Zellen	Hela-Kultur	Isolierung von 45 S-RNA
Liao 1965	Phenol 0,5 % SDS pH 5,0 65 C	Kerne und Polysomen	Ratten-Prostata	
Ristow,Köhler 1966	Phenol 0,5 % SDS pH 7,2 20 C	Polysomen, Ribosomen, subribosomale Partikel	KB-Zellen	Test auf Aminosäure-Einbau
Konings 1968	Phenol pH 7,6 0,01 % EDTA 39 C	rohe Kerne aus Augenlinsen	Kalb	Test auf m-RNA
Konings 1968	Phenol pH 7,6 1.) 32 C pH 8,3 2.) 65 C	Homogenat	Rattenleber	Test auf m-RNA
Georgiev, Samarina 1963	Phenol 0,14 M NaCl pH 6,0 1.) 4 - 10 C 2.) 40- 45 C 3.) 60- 65 C	Kerne	Rattenleber	DNA-like-RNA
Sekeris 1967	Phenol 0,14 M NaCl pH 5,0 o,5 % SDS Bentonit, PVS 65 C	Kerne	Rattenleber	Isolierung schnell markierbarer RNA
Muramatsu 1965	Phenol pH 5,1 o,3% SDS, o,1% 8-OH-Chinolin 4 C, 65 C	Kerne und Nucleoli	Rattenleber	45 S-RNA im Nucleolus
Wilkinson 1965	Phenol-Kresol 6% Aminosalicylat 3 M Na-Acetat pH 6,o	Gefrorenes, zerkleinertes Gewebe	Rattenleber	Schnellmarkierbare RNA, Trennung von DNA, t-RNA u.Glykogen
[illegible]	Phenol-Kresol, 1% Triisopropyinaphthalinsulfonat, 6% Butan-2-ol, 6% Aminosalycylat, 1% NaCl	Homogenat	Rattenleber	22-24 S-DNA

Mit Hilfe von Markierungstechniken fanden SIBATANI (93) und später GEORGIEV (31) u. a., daß bei Anwendung der ursprünglichen Phenolmethode nicht die gesamte RNA extrahiert wird. Interessanterweise handelt es sich dabei besonders um "schnell markierbare" RNA. Ein großer Teil der RNA, der - wie sich später herausstellte - vor allem aus dem Chromatin bzw. den Nucleoli stammte, blieb in der Zwischenschicht zwischen Phenol- und Wasserphase (sogenannte Interphase). Wie GEORGIEV und MANTIEVA (83) feststellten, ließ sich diese RNA mit heißem Phenol (bei etwa 65 °) extrahieren. Auch nach mehrmaliger Extraktion bei so hohen Temperaturen war es jedoch nicht möglich, die gesamte RNA aus dieser Interphase zu isolieren.

GEORGIEV und MANTIEVA (83) gingen etwa folgendermaßen vor: Bei einem pH von 6 wurde die Zellfraktion - es handelte sich meistens um Kerne - in 0,14 M NaCl bei verschiedenen Temperaturen extrahiert. Tiefe Temperaturen um 4 bis 10 ° C extrahierten nur t-RNA, Temperaturen bis zu 55 ° extrahierten hauptsächlich ribosomale RNA, Temperaturen zwischen 60 und 65 ° befreiten DNA-ähnliche RNA aus dem Proteinkomplex. Allerdings betrug die Summe nur etwa 30 bis 90 % der nucleochromosomalen RNA. Diese sogenannte "DNA-ähnliche" RNA hatte eine Basenzusammensetzung, die zwischen der von ribosomaler RNA und der von DNA lag. Ribosomale RNA hat ein Basenverhältnis von Uracil : Guanin von etwa 0,6 bis 0,7. DNA-ähnliche RNA müßte ein Basenverhältnis von U/G von etwa 1,4 zeigen. Bei den Experimenten von GEORGIEV (83) lag das Basenverhältnis von U/G in der letzten Fraktion, also in der 60 bis 65 °-Fraktion, über 1. Diese Methode von GEORGIEV und Mitarbeitern ist von vielen anderen Forschern übernommen worden (BRUNS 13, MAHLER 55, COOLSMA 21, GRUBER 21).

Statt einer fraktionierten Extraktion bei verschiedenen Temperaturen wurde auch eine Variierung der pH-Werte zur Subfraktionierung der RNA versucht (HADJIVASSILIOU und BRAWERMANN, 37). Es wurde gefunden, daß bei höheren pH-Werten extrahierte RNA (pH 8 bis 9) die höchste "Messenger-Aktivität" besaß und eine Basenzusammensetzung hatte, die sehr verschieden von ribosomaler RNA war.

Da es uns darauf ankam, mit einer dieser Methoden die RNA möglichst quantitativ aus dem Gewebe zu isolieren, andererseits aber darauf geachtet werden mußte, daß die Nucleinsäure möglichst wenig durch RNAsen verändert wurde, haben wir folgendes Verfahren zur RNA-Isolierung benutzt:

1.) Extraktion mit Phenol, das nach KIRBY (46) m-Kresol und 8-Hydroxy-Chinolin zur Verminderung der Oxydation des Phenols enthielt;

2.) Benutzung eines Detergens, wir wählten Laurylsulfat in einer Endkonzentration von 0,5 % (gleichzeitig RNAse-Inhibitor);

3.) Zufügung eines RNAse-Inhibitors PVS (Poly-Vinyl-Sulfat);

4.) Natrium-Acetat-Puffer, Endkonzentration 50 mM pH 5,2 (bei diesem pH ist die RNAse-Aktivität ebenfalls stark eingeschränkt).

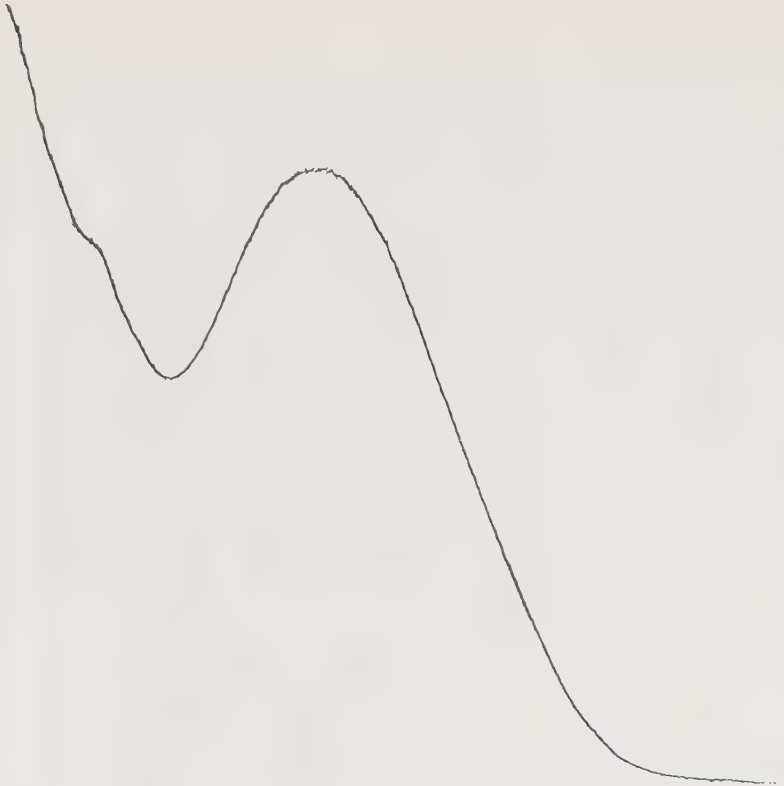
Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Die Embryonen bzw. andere Gewebe (Lebergewebe) wurden in 0,32 molarer Saccharose-Lösung mit 3 mM Magnesium und 10 mM Tris-Puffer pH 7,4 mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator (5 ml) zerkleinert. Nach dem Homogenisieren wurden entsprechende Anteile von Laurylsulfat, Poly-Vinyl-Sulfat, Magnesiumchlorid und Natriumacetat zugefügt, daß die Endkonzentration an Laurylsulfat 0,5 %, an Poly-Vinyl-Sulfat 50 µg/ml, an Magnesiumchlorid 3 mM und an Natriumacetat 50 mM betrug. Dieser Lösung wurde das gleiche Volumen wassergesättigter Phenollösung zugegeben, die pro Liter 140 ml Meta-Kresol und 1 g 8-Hydroxy-Chinolin enthielt. Die Extraktion der RNA erfolgte durch einstündiges Schütteln bei 20 bis 25 ^{o} C dieser Mischung. Die Phasen wurden dann durch fünfzehn-minütiges Zentrifugieren bei 5000 Umdrehungen/Minute in einer Christ-Junior-KS-Kühlzentrifuge getrennt. Die Phenolphase wurde mit $^{1}/_{10}$ des Volumens an Wasser nachextrahiert und die vereinigten wässerigen Phasen erneut mit dem gleichen Volumen an Phenol-Kresol-Lösung $^{1}/_{2}$ Stunde bei Zimmertemperatur extrahiert. Da eine weitere enzymatische Behandlung geplant war, mußte das Phenol aus der Lösung entfernt werden, welches in der wässerigen Phase verblieben war. Dies kann durch Äther-Ausschüttelung erfolgen. Der in der wässerigen Lösung zurückbleibende Äther wurde durch Einleitung eines Luft- oder Stickstoffstromes entfernt.

In einigen Versuchsreihen wurde anstelle der Ausätherung eine mehrstündige Dialyse gegen Acetatpuffer (0,01 M, pH 5,2) angeschlossen. Diese Dialyse erfolgte in einem Schnelldialysator der Firma Isco.

Bei dieser Art der Extraktion läßt es sich nicht vermeiden, daß DNA mit extrahiert wird (MIZUNO et al. 68). Der DNA-Gehalt in dieser Lösung ist besonders groß bei Verwendung von embryonalem Gewebe. Um die DNA aus der Lösung zu entfernen, wurde die RNA-Fraktion mit einer RNAse-freien DNAse der Firma Schwarz-[illegible] 45 Minuten bei Zimmertemperatur behandelt. Die Endkonzentration

an DNAse betrug 50 µg/ml. Die DNA wird unter diesen Bedingungen in kleine Bruchstücke gespalten, die nicht mehr mit Alkohol fällbar sind.

Aus einer wässerigen Lösung kann man RNA einmal durch sehr hohe Salzkonzentrationen ausfällen, zum anderen durch 70 %-igen Alkohol. Da wir es sehr oft mit außerordentlich geringen RNA-Mengen zu tun hatten, mußte darauf geachtet werden, daß selbst geringste Mengen an RNA quantitativ ausgefällt wurden. Es ist bekannt, daß Nucleinsäuren sehr leicht an Glas adsorbiert werden. Deshalb wurde zur Fällung der RNA immer silikonisiertes Glasgerät benutzt. In diesen speziell vorbereiteten Gläsern lassen sich Mengen von etwa 50 µg RNA durchaus erkennen. Damit die Fällung wirklich quantitativ erfolgte, wurde die Ionenstärke in der Lösung durch Kaliumacetat auf eine Endkonzentration von etwa 2 % erhöht. Anschließend wurde die RNA mit dem doppelten Volumen Alkohol bei minus 18 bis minus 20 ^{o} über Nacht ausgefällt. Die auf diese Weise hergestellte RNA ist praktisch frei von Proteinen und DNA. Aus der unten angegebenen Abbildung ist ersichtlich, daß die Relation der Extinktionen bei 260 nm zu 235 nm etwa 1,6 und die der Extinktionen bei 260 nm zu 280 nm etwa 2,0 beträgt. Dieses läßt auf eine sehr reine RNA schließen.


RNA

γ) Prinzipien der Auftrennung der RNA in verschiedene Komponenten

Die durch Phenol-Extraktion gewonnene RNA ist keineswegs eine einheitliche Substanz. Sie besteht aus einer Reihe von verschiedenen Komponenten, die eine unterschiedliche Kettenlänge haben. Da der Stoffwechsel und die Bildungsgeschwindigkeit der RNA-Spezies durchaus verschieden sein kann, ist es häufig notwendig, diese einzelnen Komponenten getrennt zu untersuchen. Zur Trennung dieser RNA-Mischungen eignen sich mehrere Methoden, z.B. Säulen-Chromatographie an Calcium-Phosphat (BRAUN, NEWMAN und STUART, 12), substituierte Cellulose (DEAE oder EKTEOLA), (BRADLEY und RICH 6), (GOLDWAIT 35), Chromatographie an Sephadex (BOMAN u. IHERTEN 5). Eines der geeignetsten Verfahren ist die Chromatographie an methyliertem Albumin-Kieselgel (MANDELL und HERSHEY 56, SUEKA und CHENG 99, SUEKA und YAMANE 100). Bei dieser meist kurz als "Mak-Säulen-Chromatographie" bezeichneten Methode wird die RNA mit ansteigender Ionen-Konzentration - meistens wird NaCl benutzt - extrahiert und wieder von der Säule eluiert. Der Nachteil all dieser Methoden besteht darin, daß man größere Mengen RNA zur Verfügung haben muß und daß die einzelnen RNA-Komponenten meist in recht großen Volumina der Elutionsflüssigkeit anfallen.

Eine weitere, für analytische Zwecke sehr geeignete Methode zur Trennung verschiedener RNA-Komponenten besteht in der Elektrophorese an Polyacrylamid-Gel. Diese Methode hat den Vorteil, daß man mit sehr kleinen Mengen von ungefähr 50 µg RNA auskommt und man zum anderen außerordentlich scharfe Banden der verschiedenen RNA-Komponenten erhält. In dieser Beziehung übertrifft das Verfahren alle anderen bisher bekannten Methoden. Meist erwiesen sich auf andere Art getrennte RNA-Komponenten bei einer nachträglichen Acrylamid-Gel-Elektrophorese als uneinheitliche Substanz, d.h. als eine Fraktion, die aus mehreren Komponenten besteht (LOENING 54, BISHOP 4, RICHARDS 78, GOULD 33/4).

Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß sich das Gel einerseits sehr schwer handhaben läßt und zum anderen eine Rückgewinnung der RNA und die weitere Untersuchung, beispielsweise die Bestimmung von Radioaktivität in dieser RNA, nach den angegebenen Methoden nicht durchführen läßt.

δ) Auftrennung der RNA-Komponenten im Saccharosegradienten

Eine sehr geeignete und einfache Methode zur Differenzierung verschiedener RNA-Komponenten besteht in der Dichtegradienten-Zentrifugation. Nachteile gegenüber der Polyacrylamidgel-Elektrophorese bestehen z.B. darin, daß die Auftrennung nicht so scharf erfolgt, wie bei der Elektrophorese. Von Vorteil ist aber, daß man die einzelnen Fraktionen sammeln kann, um mit der RNA weiterzuarbeiten. Das Prinzip dieser Methode ist in der nebenstehenden Abbildung (2) zu ersehen. Die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde 1953 von BRAKKE (7/8) und von SINCLAIR (15) eingeführt. Sie ist ganz allgemein eine Methode zur Fraktionierung von Makromolekülen. Eine einfache Apparatur ist 1960 von BRITTEN und ROBERTS (10) beschrieben worden. Diese Autoren benutzten einen linearen Saccharosegradienten zwischen den Konzentrationen 5 % und 20 % zur Trennung der Untereinheiten von Coli-Rib. Seither gilt die Saccharose-Gradienten-Zentrifugation als Standardmethode zur Trennung und Fraktionierung von Nucleinsäuren (MARTIN und AMES 65, ANDERSON 1, NOMURA, HALL und SPIEGELMAN 73, Mc. CARTHY, STEPHART und BROWN 15).

Nach dem Prinzip der kommunizierenden Kammern konstruierten wir eine Maschine, die gleichzeitig 3 Gradienten herstellen kann. Die Laufgeschwindigkeit in das Zentrifugenröhrchen läßt sich durch einen besonders feinen Regulierungsmechanismus während des Laufes verändern (3). Dies ist wichtig, da besonders im unteren Drittel des Gradienten Turbulenzen durch die zulaufende Saccharose entstehen können. Mit Hilfe dieser Maschine können Gradienten für die verschiedensten Rotorentypen hergestellt werden (SW 25/1, 30 ml; SW 39, 5 ml; SW 41, 11 ml; SW 50, 5 ml; SW 65, 5 ml).

MARTIN und AMES (65) zeigten, daß ein bestimmter Rotor in Verbindung mit einem spezifischen Gradienten nahezu konstante Sedimentationsgeschwindigkeiten liefert. Wir prüften daher für die von uns verwendeten Rotoren (meistens SW 65 und SW 41) die Reproduzierbarkeit der Gradienten. Aus der Abbildung 4 sind die Ergebnisse zu ersehen. Als Testsubstanz diente ribosomale RNA, die aus Lebergewebe nach der Phenolmethode isoliert wurde. Es sind jeweils 3 Peaks zu erkennen. Nach der Gleichung von MARTIN und AMES sind die Sedimentations-Konstanten für die beiden ribosomalen Komponenten der Warmblüter-RNA 28 S und 18 S, für die t-RNA 4 S. Diese 3 Peaks sind aus den Abbildungen deutlich zu ersehen.

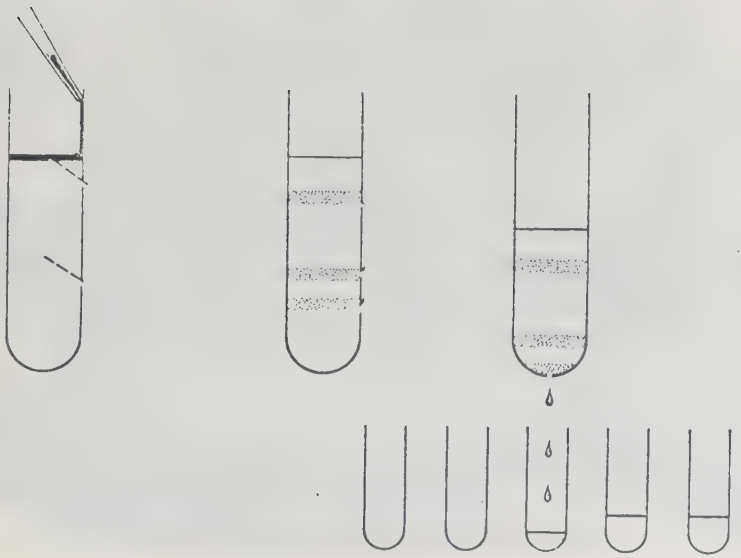


Abbildung 2

Die Abbildung zeigt das Prinzip einer Saccharose-Gradientenzentrifugation. Es handelt sich um eine Abbildung aus "The Biochemistry of the Nucleic Acids" (DAVIDSON).

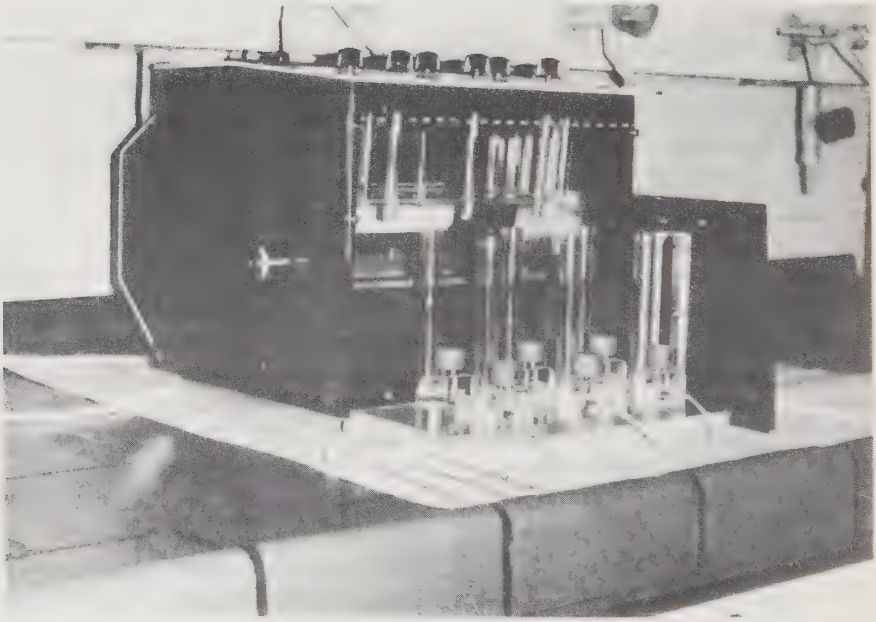


Abbildung 3

Die Abbildung zeigt die Hauptbestandteile der in unserer Wertkstatt hergestellten Gradientenmaschine. In den vorderen Zylindern befindet sich die konzentriertere Saccharose-Lösung, in den hinteren die dünnere. Die vorderen Zylinder dienen gleichzeitig als Mischkammer.

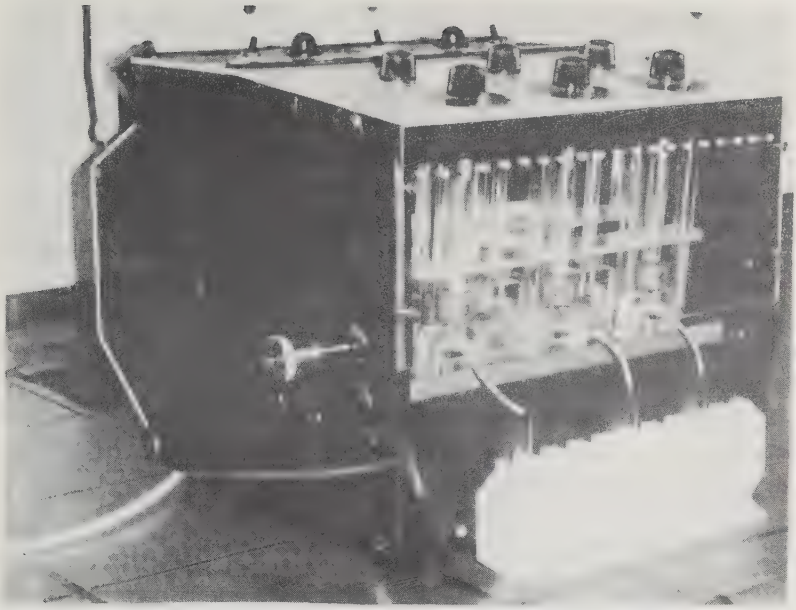


Abbildung 3a

Diese Abbildung zeigt die Gradientenmaschine in Funktion. Es werden gleichzeitig 3 Gradienten hergestellt. Die Laufgeschwindigkeit läßt sich mit Hilfe der Drehknöpfe auf der oberen Platte des Gerätes sehr fein regulieren.

Die Maschine zur Herstellung von Gradienten ist von Herrn H. Dietz konstruiert und in der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts hergestellt worden. Ihm sei an dieser Stelle für sein Interesse an meinem Problem und seine Hilfsbereitschaft herzlichst gedankt.

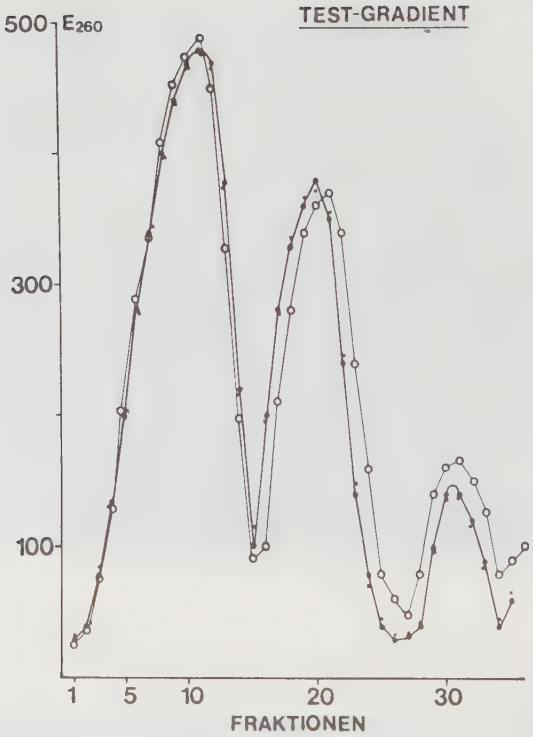


Abbildung 4

Die Abbildung zeigt ribosomale RNA (extrahiert nach Kirby) nach Zentrifugation in einem Saccharose-Gradienten 5% / 20% bei 64.000 UpM 165 Minuten 2°C im SW 65. Die Kurven geben die Extinktionen bei 260 nm wieder. Die Abbildung zeigt die Reproduzierbarkeit von 3 verschiedenen Gradienten innerhalb eines Laufes. Die dritte Kurve ist durch X symbolisiert. Man kann erkennen, daß die Genauigkeit $\pm$ 1 Fraktion beträgt.

Ein anderes Problem ist die Reproduzierbarkeit der verschiedenen Gradienten für einen Lauf, bzw. der Vergleich der Resultate, die in verschiedenen Läufen gewonnen wurden. Durch die genaue Regulierbarkeit unserer Gradientenmaschine war es möglich, 3 verschiedene Gradienten herzustellen, die innerhalb eines Laufes praktisch vollkommen identisch waren. Aber auch Gradienten aus verschiedenen Läufen, die unter praktisch identischen Bedingungen behandelt wurden, sind gut miteinander zu vergleichen. Die einzelnen Peaks weichen nicht mehr als $\pm$ eine Fraktion voneinander ab.

Schon 1961 zeigten MARTIN und AMES (65), daß man nahezu konstante Sedimentationsbedingungen erhalten kann, wenn man bei demselben Rotor und dem gleichen spezifischen Gradienten bleibt, vorausgesetzt, daß die Temperatur absolut konstant gehalten wird. Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Makromoleküls hängt nicht nur von der Gestalt des Partikels ab, sondern in ganz entscheidendem Maße von der Viskosität des Mediums. Diese aber ist von der Temperatur abhängig. Es ist also für den Vergleich verschiedener Läufe unbedingt darauf zu achten, daß die Temperatur konstant geblieben ist. Dies ist in den neueren Ultrazentrifugen der Firma Beckman in ihren Spinco-Modellen der Reihen K und B mit hinreichender Genauigkeit gewährleistet, bei den einfachen L 50-Zentrifugen nicht.

Die Wahl des Rotors hängt von der zu trennenden Menge und dem Zweck ab. Rotoren, die eine große Kapazität haben, wie etwa der SW 25/1, sind geeignet, um pro Gradient mehr als 3 mg RNA zu trennen. Der Nachteil besteht aber darin, daß man sehr lange Laufzeiten von 16 Stunden und mehr benötigt, um eine ausreichende Trennung der ribosomalen Komponenten zu erhalten. Dies kann natürlich für empfindliche Substanzen wie Messenger-RNA von ganz entschiedenem Nachteil sein. Um die Laufzeiten zu verkürzen, sind in neuerer Zeit Rotoren entwickelt worden, die eine wesentlich höhere Umdrehungszahl pro Minute gestatten. Der Nachteil dieser Rotoren besteht in ihrem wesentlich verkleinerten Volumen auf 1 bzw. 5 ml. Andererseits verkürzt sich die Laufzeit zur Trennung von ribosomaler RNA von 16 auf 2 $^{1}/_{2}$ Stunden (SW 65). Ein weiterer Vorteil ist in der enormen Trennschärfe zu sehen. Natürlich kann wegen der kleineren Grundfläche in diesem Rotor nur eine geringere Substanzmenge auf den Gradienten aufgetragen und getrennt werden. Da aber in unserem Falle bei der Trennung embryonaler RNA-Komponenten dieses Problem nicht gegeben war (in der Regel betrug die Menge etwa

Abbildung 5

Die Abbildung zeigt die in unserer Werkstatt hergestellte Fraktionier-Einheit. Bei 10 Tropfen/Fraktion ergibt ein 5 ml-Gradient 35 bis 36 Fraktionen.

500 µg RNA), wurde dieser Rotor routinemäßig benutzt. Auch RIS_TOW und KÖHLER (80) geben diese Art der Dichtegradienten-Zentrifugation mit dem SW 65 an.

Besonders kritisch ist die Gewinnung der Fraktionen nach dem Lauf. Bei den verschiedenen Gradienten - sowohl aus einem Lauf als auch aus verschiedenen Läufen - muß die Tropfengröße und die Tropfgeschwindigkeit beim Anstechen der einzelnen Gradienten sehr konstant gehalten werden. Da uns zur Durchführung unserer Versuche eine Durchflußküvette, wie sie von den Firmen Gilford und Zeiss angeboten wird, und die dazu gehörigen sehr teuren Spezial-Spektralphotometer nicht zur Verfügung standen, mußten die Gradienten mit der Hand fraktioniert werden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ließen wir uns in unserer Werkstatt ein kleines Gerät bauen, mit dem sich bei einiger Übung eine hinreichende Reproduzierbarkeit erzielen läßt. Das Gerät ist in der Abbildung 5 schematisch aufgezeichnet.

Im einzelnen sind wir folgendermaßen vorgegangen: Die Saccharose wurde in den jeweiligen Konzentrationen von 5, 20 und 50 % (Gewichtsprozenten) in 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,2 gelöst. Die Gradienten enthielten immer ein Kissen aus 50 %-iger Saccharose. Bei den meistens benutzten 5 ml-Gradienten (20 % → 5) betrug dieses Kissen 0,3 ml. Die mit dem oben erwähnten Gerät hergestellten Gradienten wurden 7 bis 8 Minuten in einen Tiefkühlschrank (- 18 °) gestellt und nochmals etwa 1/4 Stunde bei + 2 ° in einer Kühlinsel aufbewahrt. Die Untersuchungssubstanz wurde in 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,2 gelöst und vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen. Die Menge betrug bei den 5 ml-Gradienten 0,1 bis 0,3 ml, die Zentrifugationsdauer 160 Minuten bei 65.000 Umdrehungen/Minute bei 2 ° C.

Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Gradient angestochen und jeweils 10 Tropfen in einer Fraktion aufgefangen. So erhält man aus einem 5 ml-Gradienten etwa 35 bis 36 Fraktionen. Auf eine Fraktion entfielen also 0,135 bis 0,14 ml. Die Fraktionen wurden mit 0,5 ml Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm in einem Spektralphotometer (DB von Beckman) in Halbmikroküvetten bei 1 cm Lichtweg bestimmt. In den Abbildungen von 9 bis 11 sind die Extinktionen der einzelnen Fraktionen (OD) gegen die Fraktions-Nummer in Diagrammen aufgetragen

In den Abbildungen 9 bis 11 ist die Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen durch Zählung eines aliquots - meistens 0,1 bis 0,2 ml - in einem Liquid-Szintillations-Counter (Packard-Tri-Carb 3380) bestimmt worden.

Wie weiter oben schon ausgeführt wurde, ist es sehr schwierig, Sedimentationskonstanten mit Hilfe linearer Gradienten festzustellen. Zwar ist diese Bestimmung in linearen Saccharosegradienten möglich (Mc. EWEN 66), aber sie ist sehr zeitraubend und umständlich. Um diese mühevollen Berechnungen - die teilweise nur mit Hilfe eines Computers zu bewältigen sind - zu umgehen, schlägt NOLL (72) vor, einen isokinetischen Gradienten zu benutzen. Diese isokinetische Technik kann so angewendet werden, daß Gradienten hergestellt werden, in denen die linear ansteigende Gravitätskraft mit zunehmender Entfernung der Partikel (Polysomen, Ribosomen, RNA etc.) vom Rotationszentrum genau kompensiert wird durch einen äquivalenten Anstieg der Gegenkräfte (Viskosität, Auftrieb) (Mc. CARTHY, STAFFORD, BROWN 75). Die Vorteile eines solchen isokinetischen Gradienten liegen auf der Hand. Man kann auf einfache Weise Sedimentationskonstanten bestimmen, bzw. bei bekannter Sedimentationskonstante die gewünschte Entfernung der Partikel vom Rotationszentrum genau festlegen und damit die Kapazität eines Rotors mit langen Röhrchen, wie sie beispielsweise im SW 40- bzw. 41-Rotor benutzt werden können, optimal ausnutzen. Es ist geplant, diese Technik in unserem Labor für spätere Untersuchungen einzuführen.

ε) Alkalische Hydrolyse der RNA und Trennung der Mononucleotide

Bevor die Basenzusammensetzung bzw. die Nucleotidzusammensetzung der RNA bestimmt werden kann, müssen die in Frage kommenden RNA-Fraktionen hydrolisiert werden. So wurden 5 bis 6 Fraktionen aus dem 28 S-Peak bzw. 18 S-Peak gesammelt, mit $^1/_9$ ihres Volumens mit einer 50 %-igen Kaliumacetatlösung versetzt und mit doppeltem Volumen Alkohol über Nacht in einem Tiefkühlschrank (- 20 °) ausgefällt. Wegen der sehr geringen Menge der RNA (es handelte sich meistens um 100 bis 200 µg) wurde die Fällung wieder in silikonisierten Zentrifugengläsern ausgeführt. Das Präzipitat wurde durch 15-minütiges Zentrifugieren in einer Junior-KS-Kühlzentrifuge gesammelt und in 0,1 bis 0,2 ml 0,3 KoH-Lösung aufgenommen. Die Hydrolyse erfolgte 18 Stunden lang bei 37 °. Nach MARRIAN, SPICER, BALIS und BROWN (64) ist dies eine sehr schonende Methode. Unter den Bedingungen soll kein Cytidin-Monophosphat zu Uridin-Monophosphat desaminiert werden. 1 n Alkali bei 37 ° und 12 Stunden verursacht etwa 33 % Desaminierung. Auch 0,1 n Alkali bei 100 ° und 2 Stunden hat 30 % Desaminierung zur Folge.

Die Trennung der auf diese Weise hergestellten Mononucleotide (unter dieser Bedingung erfolgt eine 100 %-ige Hydrolyse der RNA) geschah durch Hochspannungs-Elektrophorese. Diese Art der Trennung ist von DAVIDSON und SMELLI (23) 1952 eingeführt worden. Das alkalische Hydrolisat wird mit PCS angesäuert, das unlösliche Kaliumperchlorat durch Zentrifugation entfernt und die auf pH 4 gebrachte Flüssigkeit in kleinen Anteilen auf Elektrophoresepapier der Firma Schleicher & Schüll (2043 b) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4.500 Volt, das sind 100 Volt/cm, in einer Camag-Elektrophorese-Apparatur. Die Läufe erfolgten in einem Zitronensäure-Citrat-Puffer 50 mM bei pH 3,6. In 30 bis 45 Minuten waren die Substanzen sehr gut getrennt, über eine Gesamtlaufstrecke von 10 bis 15 cm. 30 Minuten Laufzeit sind auch von SMITH (95) angegeben. Bei diesen hohen Spannungen ist es notwendig, daß das Elektroferogramm ausreichend gekühlt wird. Dies geschieht in der Camag-Elektrophorese-Apparatur mit Hilfe von Leitungswasser. Das Papier wird mit Hilfe eines aufblasbaren Plastiksackes fest an eine wassergekühlte Glasplatte gepreßt. Dadurch ist eine gleichmäßige Wärmeableitung gewährleistet. Nach dieser Auftrennung werden etwa 96 bis 99 % des einzelnen Nucleotidphosphates wiedergefunden. Bei der alkalischen Hydrolyse und Präzipitation des $KClO_4$ gehen etwa 3 % der Gesamtnucleotide verloren, nach der Elektrophorese etwa ebenfalls 3 %. Die Gesamtausbeute, bezogen auf die ursprünglich eingesetzte RNA beträgt also etwa 94 %.

Nach CLICK (19) ist es möglich, das klassische Verfahren der Nucleotidtrennung, nämlich die Neutralisation mit PCS, zu umgehen und direkt das alkalische Hydrolysat aufzutragen und zu trennen. Dazu ist es nötig, einen relativ hochmolaren Puffer zu benutzen, um Schwanzbildungen durch pH-Verschiebungen zu vermeiden. Der Nachteil besteht aber in einer sehr starken Erhitzung des Elektroperogramms. Eine intensive Kühlung ist notwendig, bzw. eine Reduzierung der Spannung. Es sind relativ lange Laufzeiten von mehr als einer Stunde zur guten Trennung notwendig. Der Vorteil ist aber darin zu sehen, daß sehr wenig Substanz bei der Aufarbeitung verlorengeht. Deshalb wurde dieses Verfahren häufig von uns verwendet. Die präzipitierten RNA-Komponenten (28- bzw. 18-S vom Saccharose-Gradienten) wurden in 50 µl 0,3 n KOH gelöst und in einer Kapillare eingeschmolzen. Dann erfolgte die 18-stündige Inkubation bei 37 °. Die Substanz wurde auf ein mit Puffer angefeuchtetes Elektrophorese-Papier aufgetragen. Die Trennung erfolgte in 0,2 M Zitronensäure-Citrat-Puffer pH 3,6 bei einem Spannungsgradienten von 1.000 bis 1.200 Volt und einer Laufzeit von ungefähr 1 1/4 Stunden.

Abbildung 15 :

Die Abb. zeigt Mononucleotide nach alkalischer Hydrolyse von 2ö S-RNA. Die Trennung erfolgte durch Hochspannungselektrophorese in o,2 M Zitronensäure-Citratpuffer, pH 3,6o bei 2ooo V (= 4o V/cm) 45 Minuten. Die Mononucleotide verhalten sich bei diesem ph-Wert wie Anionen. Die Reihenfolge ist vom Start (unten): CMP,AMP, GMP, UMP.

Dieses Verfahren wurde immer dann angewendet, wenn sehr geringe Substanzmengen vorlagen. Nach dem Trocknen wurden die Flecken unter einer UV-Lampe lokalisiert, markiert und ausgeschnitten. Als Blindwerte dienten Flächen gleicher Größe neben den einzelnen Flecken. Die Flecken wurden mit 1 ml 0,1 n HCl bei 37 ^{o} über Nacht eluiert. Es wurden die Spektren von 300 bis 220 nm aufgenommen und - wie weiter unten beschrieben - die Radioaktivität in den Proben gemessen.

ζ) Saure Hydrolyse der RNA und Trennung der Basen.

Markiert man Nucleinsäuren mit einem so unspezifischen Precursor, wie es beispielsweise die Glucose darstellt, so ist es möglich, daß nicht nur der Riboseanteil der Nucleinsäuren markiert wird, sondern auch die Basen. Es ist allgemein bekannt, daß die Purinbasen in den Nucleinsäuren relativ leicht durch eine milde Säurebehandlung, z.B. mit 1 n HCl bei Zimmertemperatur, eliminiert werden können. Dagegen ist es schwierig, mit milden Methoden die Pyrimidine aus der RNA zu isolieren. VISCHER und CHARGRAFF (103) fanden, daß ein großer Teil des Cytosins bei Behandlung mit Mineralsäuren über mehrere Stunden bei hohen Temperaturen in Uracil übergeführt wird. In vergleichenden Untersuchungen ist von diesen Autoren festgestellt worden, daß unter gleichen Bedingungen, d.h. bei 175 ^{o} in einem Bombenrohr während 90 Minuten in 10-prozentiger HCl 62 % zu viel Uracil und 63 % zu wenig Cytosin gefunden werden. Dagegen erfolgt durch 98-prozentige Ameisensäure unter gleichen Bedingungen keine Zersetzung des Cytosins. MARSHAK und VOGEL (62) geben sowohl für DNA als auch für RNA eine Hydrolyse mit PCS an. Die DNA-Basen werden durch Hydrolyse mit 7,5 n PCS, die RNA-Basen mit 12 n PCS nach einstündiger Inkubation der Nucleinsäure bei 100 ^{o} erhalten. Die Streuung ist bei diesen Autoren aber teilweise sehr beträchtlich. So geben sie für Guanin eine Streuung von etwa 17 % an, für Cytosin um 9 %, Thymin 13 %, Uracil etwa 3 % und Adenin 4 %.

Da aus den Versuchen von CHARGRAFF und VISCHER (103) klar hervorgeht, daß starke Mineralsäuren bei höheren Temperaturen die Relation in den Basen teilweise drastisch verändern, haben wir routinemäßig die schonendere Hydrolyse mit konzentrierter Ameisensäure in einem Bombenrohr bei 175 ^{o} über 2 Stunden angewandt. Die RNA-Fraktionen aus den ribosomalen Peaks wurden - wie oben beschrieben - gesammelt und ausgefällt und in 0,5 bis 1 ml Ameisensäure aufgenommen. Nach erfolgter Hydrolyse wurde die Ameisensäurelösung zur Verminderung des Drucks in einem Tiefkühlschrank etwa 1/2 Stunde aufbewahrt. Das Bombenrohr wurde geöffnet, indem die zugeschmolzene Kapillare in einer heißen Flamme geschmolzen und durch den inneren

Abbildung 18

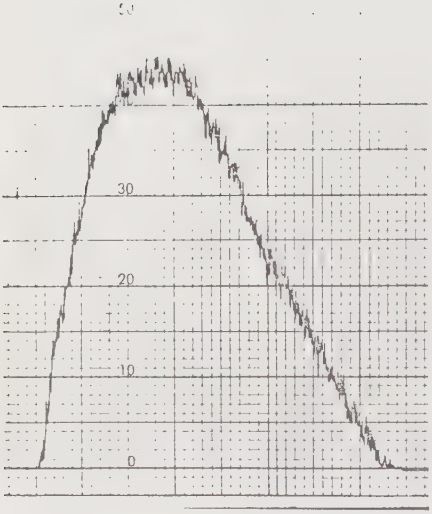
Die Abbildung zeigt Basen nach saurer Hydrolyse von 28 S-RNA. Die Trennung erfolgte durch Hochspannungselektrophorese in 50 mM Zitronensäure-Citrat-Puffer bei pH 2,50 bei 4.500 V (≈100 V/cm) während 15 Minuten. Die Reihenfolge von der Startlinie (unten) : Uracil, Guanin, Adenin, Cytosin.

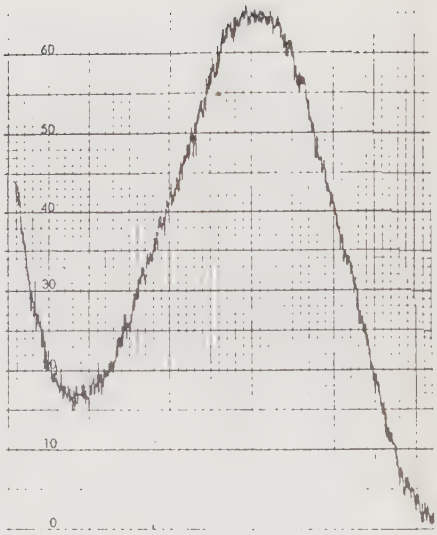
Druck geöffnet wurde (hierbei ist besondere Vorsicht geboten, da das Glasrohr leicht explodieren kann). Die Ameisensäure wurde verdampft und der Rückstand im Puffer aufgenommen. Die Trennung der einzelnen Komponenten erfolgte durch Hochspannungs-Elektrophorese, wie sie zur Trennung der Mononucleotide weiter oben schon angegeben worden ist. Der Puffer bestand aus 50 mM Zitronensäure-Citrat pH 2,5 (s. auch ZACHAU, [108]). Die Spannung betrug wieder 4.500 Volt, d.h. 100 Volt/cm, die Laufzeit etwa 10 bis 15 Minuten. Die einzelnen Substanzen waren meistens sehr gut voneinander getrennt, wenn auch die vorderen - nämlich Cytosin und Adenin - meist größere Flecken bildeten. Die Weiterverarbeitung erfolgte in gleicher Weise durch Elution mit 0,1 n HCl und Messen der Spektren, wie schon bei den Mononukleotiden beschrieben.

η) Messung der Absorptionsspektren und quantitative Bestimmung der Nukleotide und Basen.

Purin- und Pyrimidin-Derivate absorbieren Licht in den Wellenlängen zwischen 280 bis 240 nm. Aufgrund dieser physikalischen Eigenschaften ist es möglich, qualitative und quantitative Bestimmungen der Nucleinsäurekomponenten durchzuführen. Die UV-Spektren sind aber in entscheidendem Maße vom pH der Lösung abhängig. Dies ist von BEAVENN, HOLYDAY und JOHNSON ([17]) ausführlich diskutiert. Für unsere Untersuchungen ist daher sowohl für Basen als auch für Nukleotide immer ein pH von 1 bis 2 gewählt worden.

Die nach den weiter oben beschriebenen Methoden isolierten Nukleotide oder Basen sind mit 0,1 n Salzsäure über Nacht bei 37 ^{o} eluiert worden. Da das zur Elektrophorese verwendete Papier gegenüber dieser Behandlung nicht indifferent war, wurden als Referenz etwa gleichgroße Stücke in der Höhe der einzelnen Substanzen ausgeschnitten und auf die gleiche Weise behandelt. Die UV-Spektren der Substanzen wurden mit Hilfe eines Leitz-Unicam-Spektralphotometers SP 800 A in Halbmikroküvetten (0,5 bis 0,6 ml) in diesem Eluat bei Zimmertemperatur aufgenommen. Die Schichtdicke betrug in der Regel 1 cm. Da die Konzentration der Nukleotide oftmals um 2 bis 3 µg/ml lag bzw. für Basen oftmals unter 1 µg/ml, war es notwendig, die Spektren auf einem Zweitschreiber zu verstärken. Das Spektralphotometer hat für diese Zwecke eine Vorrichtung, die eine bis zu zwanzigfache Verstärkung erlaubt. Mit Hilfe dieser Einrichtung war es möglich, Nukleotide bis zu einer Konzentration von etwa 1,5 µg/ml zu bestimmen. Bei den Basen lag die Auflösung noch wesentlich darunter. Konzentrationen von 0,4 bis 0,5 µg/ml waren durchaus noch messbar. Die quantitative Auswertung erfolgte nach dem LAMBERT/BEER'schen Gesetz. Die Extinktionskoeffizienten für die einzelnen Substanzen wurden dem Abschnitt "Optical Properties of Nucleic Acids and Their Components" in "The Nucleic Acids" von CHARGAFF und DAVIDSON ([17]) entnommen.



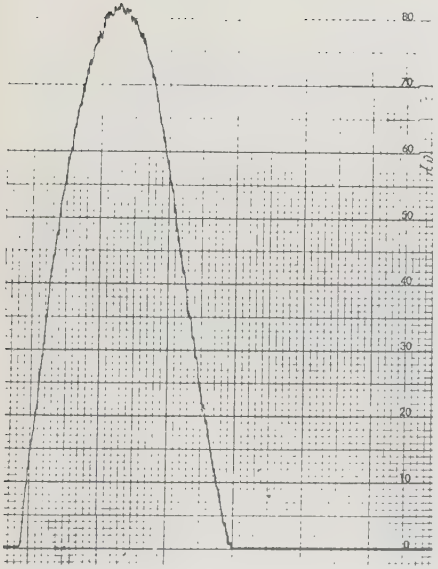


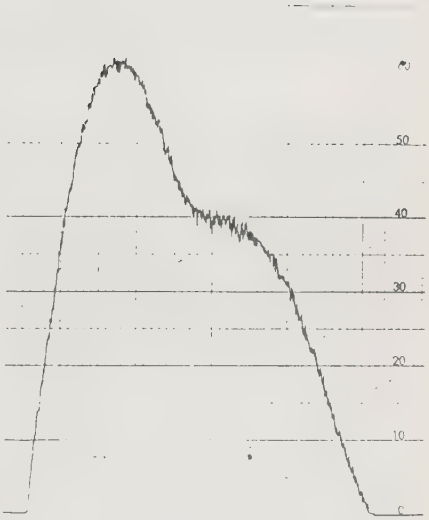
2

1

Abbildung 6

Die Abbildung zeigt die UV-Spektren von Mononucleotiden nach alkalischer Hydrolyse von 28 S-RNA und Trennung durch Hochspannungselektrophorese. Die unter einer UV-Lampe lokalisierten Flecken sind mit 0,1 n HCl bei 37°C über Nacht eluiert worden. Die Spektren wurden mit einem Leitz Sp 800 bei 20-facher Verstärkung aufgenommen. 1 = CMP, 2 = AMP, 3 = GMP, 4 = UMP.





4 3

Abbildung 6a

Die Abbildung zeigt die UV-Spektren von Mononucleotiden nach alkalischer Hydrolyse von 28 S-RNA und Trennung durch Hochspannungselektrophorese. Die unter einer UV-Lampe lokalisierten Flecken sind mit 0,1 n HCl bei 37°C über Nacht eluiert worden. Die Spektren wurden mit einem Leitz Sp 800 bei 20-facher Verstärkung aufgenommen. 1 = CMP, 2 = AMP, 3 = GMP, 4 = UMP.

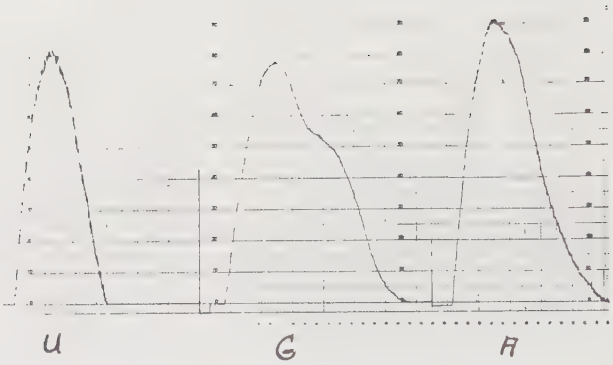


Abbildung 4

Die Abbildung zeigt die UV-Spektren von Basen der 28 S-RNA nach saurer Hydrolyse und Trennung durch Hochspannungselektrophorese. Es wurde weiter wie in Abbildung verfahren.

θ) Messung der Radioaktivität einschließlich Messung der Doppelmarkierung P^{32} - C^{14}.

Messaufbau: Für die Radioaktivitätsmessungen wurde ein Flüssigkeits-Szintillations-Zähler der Firma Packard, Modell 3380 mit Automatik, zur absoluten Aktivitätsbestimmung Modell 544 verwendet.

Es ist im Prinzip möglich, mit jedem Gerät, das 2 Kanäle besitzt, doppelt radioaktiv markierte Proben zu messen. Voraussetzung ist jedoch, daß die Energiespektren der verwendeten Radionuclide möglichst unterschiedlich sind. Die günstigsten Bedingungen ergeben sich unter Verwendung von Nucliden, deren Energiespektren 10 : 1 oder mehr auseinanderliegen, wie z.B. H_3 - C^{14} oder C^{14} - P^{32}. Bei den bisher üblichen Methoden war eine Auswertung der Zählergebnisse jedoch sehr aufwendig und zeitraubend. Sehr viel einfacher ist dieses Problem mit der sogenannten Automatik zur absoluten Aktivitätsbestimmung zu lösen.

Zum besseren Verständnis der Zähltechnik ist es notwendig, die Funktion des externen Standards sowie der Automatik zur absoluten Aktivitätsbestimmung (AAA) näher zu erläutern. Das Gerät Tri Carb Modell 3380 verfügt über einen externen Standard. Es besitzt insgesamt 5 Messkanäle, wovon 2 fest eingebaute, interne Kanäle ausschließlich zur Messung der externen Standardimpulse dienen. Die restlichen 3 Kanäle bleiben für Probenmessungen frei. Die Technik der externen Standardisierung, die sich seit vielen Jahren aufgrund vieler Vorteile gegenüber den früher üblichen Methoden, wie beispielsweise der Verwendung eines inneren Standards bewährt hat (so braucht die Probe nicht noch einmal behandelt und gezählt zu werden, die chemische Zusammensetzung wird nicht durch Fremdzusätze verändert und steht somit für weitere Messungen und Untersuchungen zur Verfügung, der Pipettenfehler wird quantitativ eliminiert), beruht auf der Verwendung einer γ- und Amerithium-Strahlenquelle zur Erzeugung eines Compton-Spektrums innerhalb des Probenglases. Löschende Substanzen stören die zu diesem induzierten Spektrum gehörenden Licht- und Energieübertragungsprozesse in der gleichen Art und Weise, wie diejenigen, die aus dem β-Spektrum der Probe resultieren. Durch die Verwendung der Kombination Radium und Amerithium erhält man eine größtmögliche Unabhängigkeit.

Bei den Flüssigkeits-Szintillations-Zählern ohne Automatik mußte die bezüglich des Löscheffektes korrigierte Zählausbeute der Probe anhand der Zählrate oder des externen Standard-Löschgradverhältnisses mit Hilfe einer Eichkurve für jedes interessierende Isotop aufgestellt werden. Bei der Verwendung der Automatik (Modell 544) ist jedoch eine Erstellung von Eichkurven nicht mehr erforderlich.

Zum besseren Verständnis sei hier eine kurze Definition des Löschgradverhältnisses (Quench) an dem Gerät Modell 3380 angeführt. Dieses wird in den beiden internen Kanälen für den externen Standard wie folgt ermittelt:

$$\frac{\text{Kanal 1 (Diskrim. H ÷) Probe + Stand.Quelle − Kanal 1 (Diskr. H ÷) Probe}}{\text{Kanal 2 (Diskrim. G ÷) Probe + Stand.Quelle − Kanal 2 (Diskr. G ÷) Probe}}$$

Die beiden Kanäle sind so geschaltet, daß man bei der Messung einer theoretisch ungelöschten Probe ein Löschgradverhältnis von "1" bekommt. Ist eine Probe mehr gequencht und dies wird fast immer der Fall sein, so ergibt sich eine Löschgradverhältniszahl, die zwischen 1 (ungelöscht) und 0 (sehr stark gelöscht) liegt.

Bei der Ermittlung einer Eichkurve ging man bisher so vor, daß man für den Löschgradverhältnisbereich, in dem die für einen Versuch zu messenden Proben lagen, Standards mit einer bestimmten Aktivität, jedoch verschiedenen Quench-Werten anfertigte und anhand dieser bekannten Proben (Eichreihe) eine Eichkurve auftrug und hieraus die absolute Aktivität der Probe ermittelte. Bei Verwendung der Automatik werden diese externen Standard-Eichkurven nicht mehr benötigt. Die Automatik arbeitet mit 10 festgelegten Löschgrad-Verhältnispunkten, also von 0 nach 01, 02 bis 09. Die Einstellung der Automatik für automatische Bestimmungen der absoluten Aktivität erfolgt in der Weise, daß für die jeweiligen Löschgradverhältnispunkte Eichproben mit einer bekannten Aktivität, jedoch verschiedenartigen Löschgraden hergestellt werden. Will man also z.B. eine Reihe von Proben messen, von denen man weiß, daß deren Quench-Wert etwa zwischen 0,4 und 0,6 liegt, so werden Proben hergestellt, von denen die eine zwischen 0,4 und 0,5 gelöscht ist, die nächste zwischen 0,5 und 0,6 und die letzte zwischen 0,6 und 0,7. Durch interne Messvorgänge wird das Löschgradverhältnis der Probe auf den nächstliegenden unteren Punkt mit einer großen Genauigkeit geführt. Es würde also in unserem Beispiel die erste Probe auf 0,4000, die zweite auf 0,5000 und die dritte auf 0,6000 gequencht. Hat die Automatik für die jeweilige Probe den Quench-Wert

erreicht, so wird die Aktivität der jeweiligen Probe in dem entsprechenden Kanal gezählt. Handelt es sich, wie in unserem Fall jetzt als Beispiel um eine Eichprobe, so wird für den entsprechenden Quenchwert - in unserem Fall 0,6 bzw. 0,5 und 0,4 - an den Segmenten der Automatik die in den Proben enthaltene Aktivität eingestellt. Die Segmente der Automatik geben die tatsächliche Zählausbeute der Probe bei diesem definierten Quench an. Mißt man nun eine Probe mit unbekannter Aktivität, die also zwischen 0,6 und 0,7 gequencht ist, so durchläuft die Automatik obigen Messprozess, bis der Fixpunkt von 0,6 erreicht ist und die Probe wird unter diesen Bedingungen gemessen, wobei am Ende der Messung die absolute Aktivität ausgedruckt wird.

Die Einstellung des Gerätes für doppelmarkierte Proben wird wie folgt durchgeführt: Die Einstellung der Automatik erfolgt im Prinzip auf die gleiche Weise wie oben beschrieben. Jedoch werden die optimalen Messbedingungen für doppelt markierte Proben, z.B. C^{14} neben P^{32}, gewählt. Dies geschieht mit einem Tastendruck an der Frontseite des Gerätes. Auf diese Weise ist es möglich, nur P^{32} in dem entsprechenden Kanal zu zählen, d.h., das energiereichere Isotop ist frei vom energieärmeren. Umgekehrt - in dem C^{14}-Kanal - befindet sich aber immer ein gewisser Anteil von P^{32}. Zur Eichung der Automatik wurden Standards hergestellt, die je Probe 0,1 µCi, das sind 220.000 Zerfälle/Minute (= dpm) jeweils eines Isotops, also entweder C^{14} oder P^{32} enthielten und bei 0,4, 0,5 und 0,6 gelöscht waren. Die Automatik wurde also mit Hilfe der Segmente auf die entsprechende Anzahl Zerfälle/Minute eingestellt und gleichzeitig konnte der Anteil des P^{32} im C^{14}-Kanal festgestellt werden. Zur Überprüfung der Eichung mit den Einzelisotopen wurden doppelt markierte Eichproben hergestellt, die also C^{14} und P^{32} enthielten. Nach Subtraktion des für den jeweiligen Quenchwert im C^{14}-Kanal enthaltenen Anteils von P^{32} wurde die eingesetzte Menge C^{14} (wieder 0,1 µCi, also 220.000 Zerfälle/Minute) gefunden. Es ergaben sich folgende Werte:

AES ratio	P^{32} im C^{14}-Kanal
0,6	18,6 %
0,5	17,4 %
0,4	16,0 %

Die Abweichung der einzelnen Proben (Vierfachbestimmungen) war nicht größer als $\pm$ 1 %. Durch Subtraktion des P^{32}-Anteils von der Gesamtzahl der Zerfälle im C^{14}-Kanal konnte also der C^{14}-Anteil der Probe bestimmt werden. Normalerweise

kann diese Arbeit auch durch die Vollautomatik durchgeführt werden. Dazu wäre jedoch eine interne Umstellung des Gerätes erforderlich gewesen. Da das Gerät auch für Doppelmarkierungen von C^{14} und H^3 benutzt werden sollte, ist auf eine Umstellung verzichtet worden. Dadurch sind obige Rechenoperationen notwendig geworden.

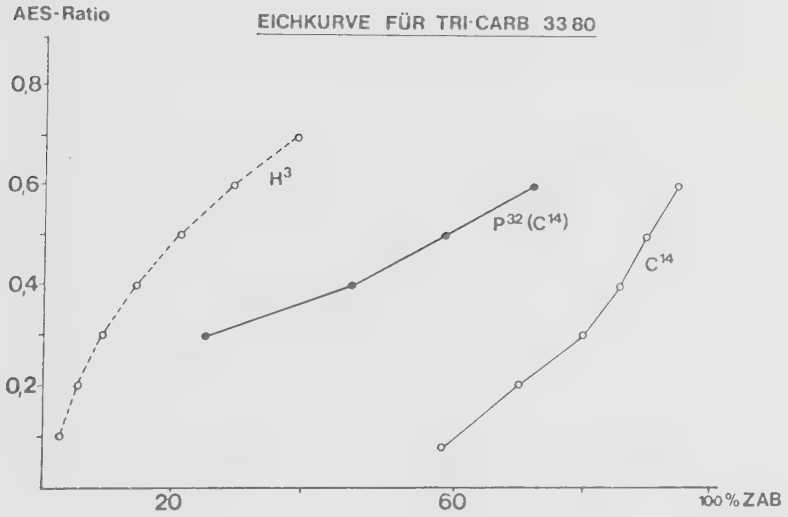


Abbildung 5a

Unter den Bedingungen der Doppelmarkierung wird P^{32} nur im P^{32} (C^{14})-Kanal gezählt. C^{14} wird in diesem Kanal nicht mitgezählt. Im C^{14}-Kanal wird C^{14} und ein gewisser Anteil des P^{32} gezählt. Die Korrektur für diesen Anteil von P^{32} im C^{14}-Kanal ergibt sich für die entsprechenden Werte der AES ratio aus der Tabelle S.27. Die dpm für C^{14} wurden also aus den Werten im C^{14}-Kanal nach Subtraktion des entsprechenden P^{32}-Anteils ermittelt.

C. Ergebnisse, Diskussion

a) Versuche über den Einbau verschiedener radioaktiver Vorstufen in Zellbestandteile von Leber und Embryo in vivo.

Die Entwicklung eines Embryos verläuft keineswegs gleichförmig. Von der Befruchtung bis zur Geburt vergehen bei der Ratte etwas mehr als 3 Wochen, etwa 21 bis 23 Tage. Von der Paarung bis zur Nidation vergehen etwa 6 Tage. Die Mitoserate pro 24 Stunden beträgt in dieser Phase etwa 1 bis 2. Nach der Implantation teilen sich die Zellen in rascher Folge.

Rattenembryonen lassen sich erst nach Tag 10 $^{1}/_{2}$ ohne Mikroskop mit einiger Übung präparieren. Da aber diese Embryonen für routinemäßige Untersuchungen noch zu klein sind und man zu viele Tiere für einen Versuch verwenden müßte, begann meine Untersuchung erst mit dem Tag 11. Auch in dieser Phase ist das Wachstum noch überaus schnell. Von Tag 11 zu Tag 12 versiebenfacht sich das Gewicht, von Tag 12 zu Tag 13 verdrei- bis vervierfacht, von Tag 13 zu 14 verdoppelt es sich etwa. Im Durchschnitt finden von Tag 11 zu 12 etwa 3 Mitosen, von Tag 12 zu 13 etwa 2 Mitosen und von Tag 13 zu 14 etwa 1 Mitose statt. Wenn die Wachstumsgeschwindigkeit am Tag 11 am höchsten ist, sollte man auch erwarten, daß der Einbau von markierten Substanzen in die RNA in dieser Phase am höchsten ist. In den angegebenen Kurven kann man diese Vermutung bestätigt sehen. Die genannten Zahlen basieren auf Trockengewichts- und DNA-Bestimmungen.

Es wurden zunächst systematische Untersuchungen darüber durchgeführt, welche Metaboliten als Precursoren zur Markierung embryonaler Zellkomponenten geeignet sind. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurden alle Metaboliten am Tage 13 der Schwangerschaft appliziert und das embryonale Gewebe 3 Stunden nach der intravenösen Gabe untersucht. Als Kriterium wurde der Einbau in die ribosomale RNA gewählt. Vorstufen,die in die RNA eingebaut werden können, sind prinzipiell in zwei Gruppen eingeteilt worden:

1.) Substanzen, bei denen das Purin- oder Pyrimidingerüst bereits fertig aufgebaut ist und
2.) klein-molekulare Substanzen, die als Bausteine einer de-novo-Synthese der Basen-Gerüste verwandt werden (s. Abbildung [8]).

Gewichtszuwachs während der embryonalen Entwicklung der Ratte

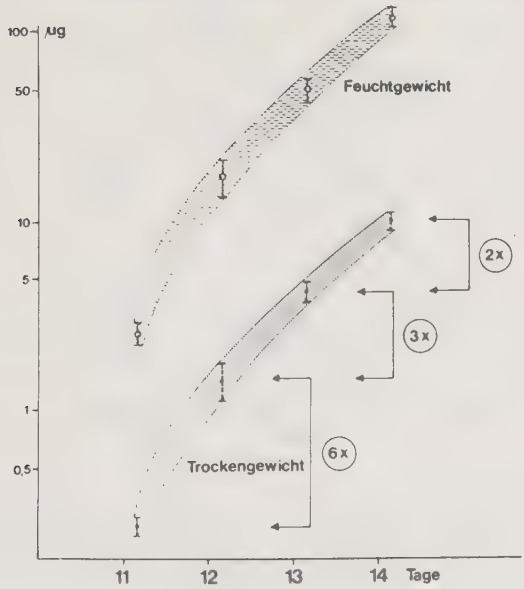


Abbildung 48

Zu den angegebenen Zeiten wurden die ganzen Embryonen herauspräpariert. Bei den 14 und 13 Tage alten Embryonen wurden für die Trocken- und Feuchtgewichtsbestimmungen jeweils 1, bei 12 Tage-Embryonen 2 und bei 11 Tage alten Embryonen 10 Keime für eine Bestimmung benutzt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung von 5 bis 12 Messungen. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist zwischen Tag 11 und 12 besonders hoch und nimmt mit zunehmendem Alter ab.

(Die Aufnahme wurde uns freundlicherweise von Dr. E. Köhler zur Verfügung gestellt).

DNA u. RNA-Zuwachs während der embryonalen Entwicklung der Ratte

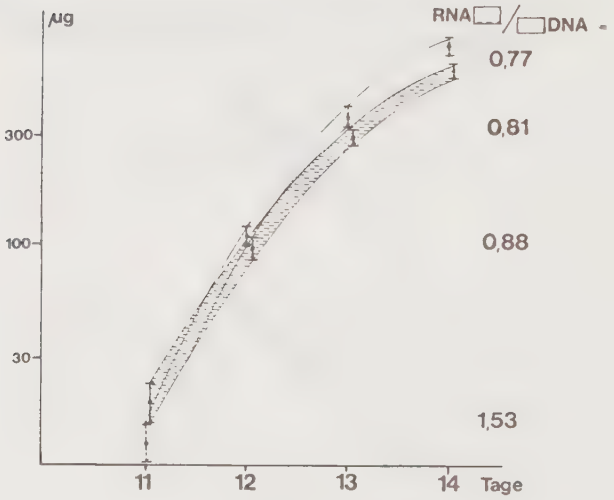
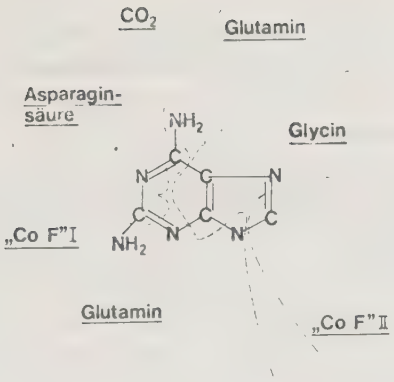


Abbildung 49

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen der Abbildung 48. Die angegebenen Punkte geben Mittelwerte Standardabweichungen von 10 bis 36 Messungen wieder. Der Quotient von RNA : DNA ist am Tag 11 über 1 und nimmt bis zum Tag 14 hin ab, so daß Werte von 0,77 erreicht werden.

(Die Aufnahme wurde uns freundlicherweise von Dr. E. Köhler zur Verfügung gestellt).



Vorstufen zur Synthese von Pyrimidin- und Purinbasen

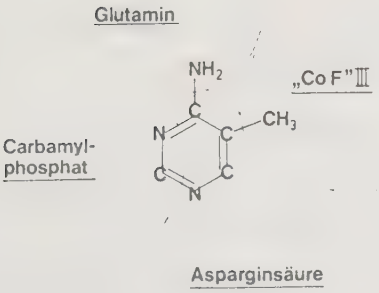


Abbildung 8

Die Abbildung gibt die Vorstufen an, die zur Bildung bestimmter Atome im Purin- bzw. Pyrimidin-Gerüst herangezogen werden.

α) Einbau von Orotsäure

Wie in der Einleitung schon erwähnt wurde, muß damit gerechnet werden, daß Precursoren, die sonst in der Biochemie zur Markierung von RNA benutzt werden, auf den Embryo nur schlecht oder gar nicht übergehen. Orotsäure ist einer der am häufigsten benutzten Precursoren. 10 bis 20 µCi C^{14}-Orotsäure intravenös injiziert, ist schon nach wenigen Minuten in der RNA der Leber nachweisbar. So lag es nahe, die Brauchbarkeit dieses Precursors für Stoffwechselversuche am Embryo näher zu untersuchen. Die Orotsäure erwies sich für Routineuntersuchungen als ungeeignet, weil sie bei niedrigen Dosierungen in der RNA des Embryos überhaupt nicht nachweisbar war und nur bei sehr hoher Dosierung in der ribosomalen RNA gefunden werden konnte. Wie aus den Abbildungen 9. ersichtlich ist, beträgt der Einbau in embryonales Gewebe - bezogen auf RNA - etwa 1 % im Verhältnis zu dem Einbau in Lebergewebe. Für Routineuntersuchungen an embryonalem Gewebe scheidet die Orotsäure deshalb aus. Erst mit 1 mCi/kg kann eine ausreichende Markierung in der ribosomalen RNA gefunden werden. Die Verwendung derartig hoher Dosen von C^{14}-markierter Orotsäure verbietet sich bereits wegen des hohen Preises.

		Leber*	Embryo*
Orotsäure	28-S	370	2,3
	18-S	270	1,5

*dpm/µg RNA

β) Einbau von Uracil und Uridin

Die Biosynthese der Pyrimidine geht vom Carbamylphosphat und von Asparaginsäure aus, es wird Orotsäure gebildet, die weiter mit 5-Phospho-Ribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) das Orotidin-5-Phosphat bildet. Durch Decaboxylierung entsteht Uridin-5-Phosphat. Orotsäure wird, wie aus den Daten dieser Arbeit hervorgeht, nur in geringem Maße in die embryonale RNA eingebaut. In folgendem Versuch wurde geprüft, ob auch U r a c i l auf den Embryo übergeht:

Bei einer Dosierung von 1 mCi/kg C^{14}-Uracil waren in der Leber keine Impulse, d.h. kein Einbau in der RNA nachweisbar. Bei den 13 Tage alten Embryonen fand unter gleichen Bedingungen ein sehr geringer Einbau in die ribosomale RNA statt. Die Möglichkeit, daß bei der intravenösen Injektion das Uracil ausgefallen ist und deshalb nicht eingebaut werden konnte, scheidet wohl aus, da bei Zimmertemperatur 3,5 mg/ml löslich sind. Die applizierte Menge betrug aber nur 800 µg. Die einfachste Erklärung ist die, daß Uracil nur sehr langsam und schlecht in die Zelle eindringt.

Der entsprechende Versuch mit dem Nukleosid U r i d i n zeigte ein wesentlich besseres Ergebnis. Wenn auch die Leber-RNA wenig markiert war, so ist doch aus dem Kurvenverlauf deutlich erkennbar, daß ein Einbau stattgefunden hat. Im Gegensatz zur Leber wird die RNA des Embryos durch Uridin sehr hoch markiert:

	Uracil		Uridin		
	Leber	Embryo	Leber	Embryo	
28-S	0	4	7,2	69	dpm/µg RNA
18-S	0	5	5,2	50	dpm/µg RNA

γ) Einbau von Formiat.

Da Formiat ein Baustein für die Purinbasen ist (s. Abbildung 8), wurde der Einbau auch dieser Vorstufe in die RNA verfolgt. Bei intravenöser Applikation von 0,8 mCi/kg C^{14}-markiertem Formiat war nach 3 Stunden folgender Einbau festzustellen:

	Leber	Embryo	
28-S	5,8	31	dpm/µg RNA
18-S	4,7	17	dpm/µg RNA

Es wurden 0,8 mCi/kg Formiat appliziert.

Vergleicht man die Werte untereinander, so ist festzustellen, daß die Inkorporation von Formiat unter den gewählten Versuchsbedingungen im 13 Tage alten Embryo vier- bis sechsmal so hoch ist wie im Lebergewebe. Für Untersuchungen des Purinstoffwechsels der Embryonen wäre Formiat also ein durchaus geeigneter Precursor.

δ) Einbau von Asparaginsäure und Glycin.

Da Asparaginsäure und Glycin zur Biosynthese der Pyrimidin- bzw. Purinnukleotide benötigt werden, wurde ihr Einbau in RNA von Leber und Embryonen gemessen. Die Dosierung betrug wieder 1 mCi/kg C^{14} uniform markierte Asparaginsäure bzw. Glycin, die Einwirkungsdauer 3 Stunden. Asparaginsäure wird unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht in die Leber-RNA eingebaut und auch Glycin ist in der Leber-RNA kaum nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist - wie aus den Abbildungen 10 11 ersichtlich - die embryonale RNA sowohl nach Gabe von Asparaginsäure als auch nach Glycin messbar markiert. Die spezifischen Aktivitäten sind aber nicht besonders hoch. So beträgt die spezifische Aktivität:

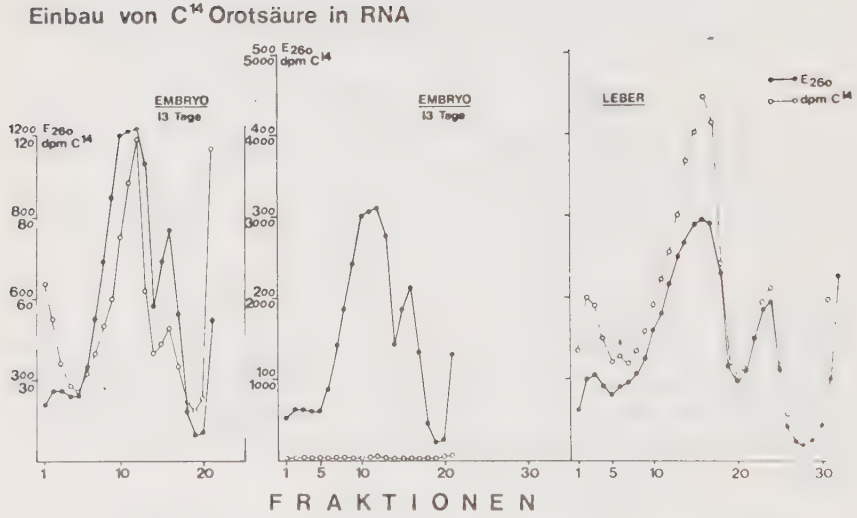


Abbildung 9

Schwangere Tiere erhielten ein mCi/kg C^{14}-Orotsäure intravenös injiziert. Die RNA wurde 3 Stunden nach der Injektion aus den Embryonen und aus Leberstücken nach der Phenolmethode isoliert und im Saccharosegradienten aufgeschlüsselt.

Im Falle von Lebergewebe ist ein hoher Einbau in beide ribosomalen Komponenten zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist bei Anwendung eines gleichen Maßstabes im embryonalen Gewebe kaum ein Einbau nachzuweisen. Der linke Teil der Abbildung gibt eine genauere Aufschlüsselung der RNA aus embryonalem Gewebe wieder. Man kann erkennen, daß die in einem außerordentlich geringen Ausmaß markierte RNA einen Markierungsverlauf zeigt, der dem der Extinktion vollkommen entspricht. Es ist daher unter diesen Versuchsbedingungen zu einem - wenn auch sehr geringen - Einbau von Orotsäure in ribosomale Komponenten des Embryos gekommen.

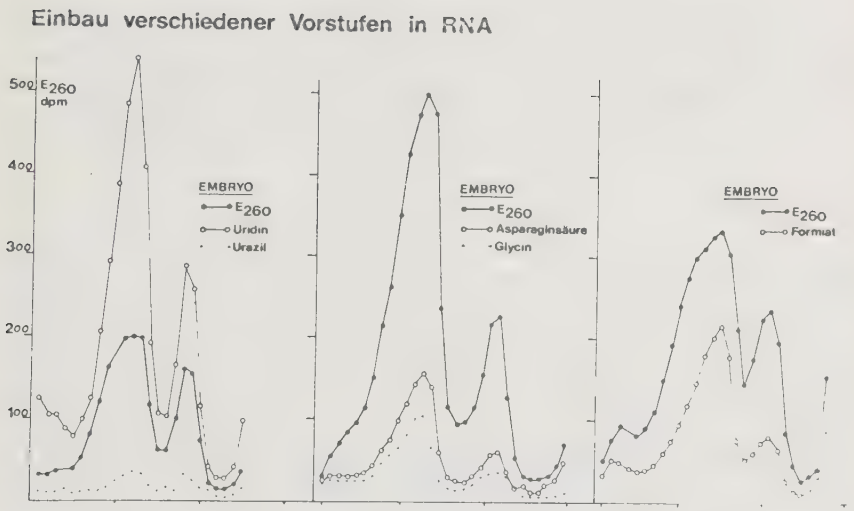


Abbildung 10

Schwangere Tiere erhielten am Tag 13 der Schwangerschaft jeweils 1 mCi der radioaktiv markierten Vorstufen/kg (0,8 mCi/kg Orotsäure) intravenös injiziert. 3 Stunden nach der Injektion wurde die RNA aus den Embryonen nach der Phenolmethode extrahiert und im Saccharosegradienten aufgeschlüsselt. Entsprechende Werte für Lebergewebe sind der Abbildung 11 zu entnehmen.

Es erfolgt eine gute Markierung der ribosomalen Komponenten nach Gabe von Uridin. Auch nach Gabe von Formiat und etwas weniger nach Gabe von Asparaginsäure und Glycin werden beide ribosomalen RNA-Komponenten markiert gefunden. Demgegenüber findet sich nur eine außerordentlich geringe Radioaktivität in der RNA nach Injektion von Uracil.

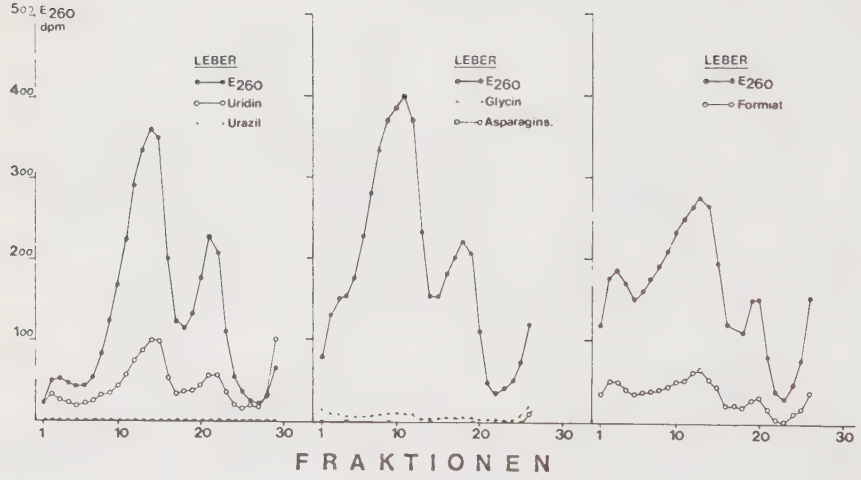


Abbildung 11

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 10 angegeben. Eine Markierung der ribosomalen RNA-Komponenten mit Uridin und Formiat ist möglich. Nach Injektion von Glycin, Asparaginsäure und Uracil findet sich kaum Radioaktivität in der isolierten RNA.

	Glycin		Asparaginsäure	
	Leber	Embryo	Leber	Embryo
28-S	0,6	5,2	0	7,8
18-S	0,6	4,2	0	6,7

Für Routineuntersuchungen sind auch diese beiden Aminosäuren nur bedingt geeignet; nicht nur wegen ihres verhältnismäßig hohen Preises, sondern weil die Markierung nicht hoch genug ist, um geringe Änderungen in der Nucleinsäuresynthese feststellen zu können.

ε) Einbau von Bicarbonat in die RNA

Wie aus der Abbildung 8 hervorgeht, wird zum Aufbau des Puringerüstes Bicarbonat benötigt. Der Vollständigkeit halber wurde auch dieser Precursor auf seine Eignung zur Markierung von Nucleinsäurebasen im embryonalen Gewebe überprüft. Es ist allerdings nicht zu erwarten, daß durch Bicarbonat eine hohe Markierung in Nucleinsäuren erreicht wird, da wahrscheinlich der größte Teil als CO_2 durch Ausatmung verlorengeht. So war es nicht überraschend, daß im embryonalen Gewebe die Gesamtaktivität nur 12 dpm/µg DNA betrug (als Vergleich: Formiat 62 und die nur schlecht auf den Embryo übergehende Orotsäure sogar 28 dpm/µg DNA). Aus der Abbildung 12 ist die Verteilung von Bicarbonat auf die verschiedenen säureunlöslichen Zellbestandteile RNA, DNA, Lipide und Protein ersichtlich. Wie man sieht, befindet sich der Hauptanteil (45 %) in der Lipidfraktion, 30 % in der RNA-Fraktion, 17 % in der DNA und etwa 9 % in der Proteinfraktion. Die Nucleinsäurefraktionen machen also doch etwa 50 % des säureunlöslichen Anteiles aus. Wegen der sehr geringen Gesamtradioaktivität ist aber Bicarbonat für unsere Zwecke zur Markierung von Nucleinsäuren unbrauchbar.

ζ) Einbau von Glucose.

Da Glucose eine Vorstufe von Pentosen ist, sollte man erwarten, daß sie in Nucleinsäuren eingebaut wird. Über den Glucosemetabolismus in embryonalem Warmblütergewebe ist wenig bekannt. Man konnte nicht vorhersagen, ob dieser Stoff in ausreichender Konzentration auf den Embryo übergeht und als Precursor für eine Markierung der RNA geeignet ist. Zwar ist allgemein bekannt, daß Glucose über den

Verteilung der Radioaktivität auf die säureunlöslichen Fraktionen
in vivo

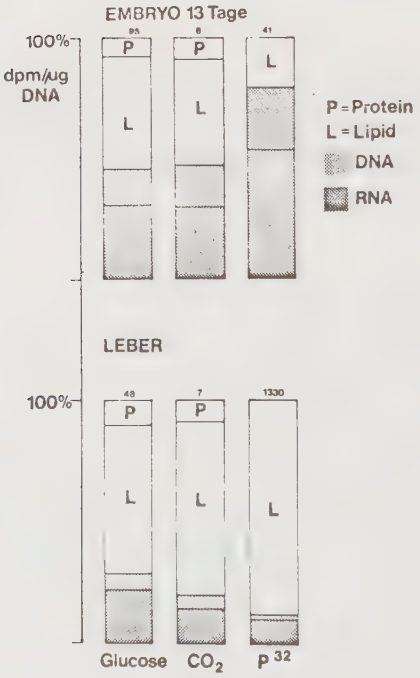


Abbildung 12

Die Versuchsbedingungen entsprechen denen der Abbildung 14. Alle Substanzen wurden schwangeren Tieren am Tage 13 der Schwangerschaft in einer Dosierung von 1 mCi/kg (P^{32} 3 mCi/kg) intravenös appliziert. Die Verteilung der Radioaktivität auf die säureunlöslichen Fraktionen wurde 3 Stunden nach der Injektion durchgeführt.

Pentosephosphat-Weg als Grundbaustein der Nucleinsäuren dient (HORECKER, 39), und zwar vornehmlich für den Aufbau der Ribose. Es wäre aber ein Analogieschluß, dieses auch für embryonales Säugetiergewebe von Warmblütern anzunehmen.

Die Gabe der Glucose erfolgte auch in diesem Falle in der Dosierung von 1 mCi/kg intravenös. Das entsprach je nach Charge ungefähr 5 bis 7 µM C^{14}-Glucose, uniform markiert. Als Vergleichsorgan wurde wiederum Leber herangezogen. Während nach 3 Stunden in der Leber kaum ein Einbau festzustellen war, folgte die Radioaktivitätskurve der embryonalen RNA nach Trennung im Saccharosegradienten genau der Kurve der optischen Dichte. Inkubiert man die RNA mit RNase (etwa 50 µg/ml, 20 bis 30 Minuten bei 20 ^{o} C), so ist ribosomale und hochmolekulare RNA nicht mehr im Saccharosegradienten nachweisbar. Die Nucleinsäuren, und zwar sowohl die DNA als auch die RNA, wurden bei unseren Experimenten nach mehreren Verfahren isoliert hochgereinigt und die Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillations-Zähler bestimmt. Durch dieses Verfahren wurde ausgeschlossen, daß die Glucose nur an die RNA oder DNA adsorbiert war. Es ist somit gesichert, daß Glucose in die embryonalen Nucleinsäuren eingebaut wird.

η) Einbau von P^{32}

Phosphorylierungsreaktionen sind in der Biochemie weit verbreitet. Die Nucleinsäuren enthalten bekanntlich pro Mononukleotid-Einheit ein Phosphor-Atom in Form des Phosphates als Diester gebunden (s. Abbildung 3). Die Synthese der Nucleinsäuren ist nur aus den Triphosphaten möglich. Allerdings wurden die beiden terminalen Phosphatreste bei der Polymerisierung als Pyrophosphat abgespalten, so daß nur das α-P-Atom der Triphosphate in den Nucleinsäuren erscheint. Bei der de-novo-Synthese der Nukleotide stammt das α-P-Atom in jedem Falle aus P-r-PP - also letztlich aus ATP. Auch bei der Bildung von Triphosphaten durch Phosphorylierung von Nucleosiden oder auch von Basen wird der Phosphat-Rest im wesentlichen aus ATP geliefert.

Zur Biosynthese der Nucleinsäuren ist daher das P h o s p h a t ein wichtiger Baustein. Es wurde geprüft, ob Phosphat in Form des Ortophosphates auf den Embryo in einer ausreichenden Menge übergeht: Schon bei der relativ geringen Dosierung von 800 µCi/kg konnte im 13 Tage alten Embryo in der RNA eine durchaus nachweisbare Markierungsrate gefunden werden. Auch die Leber-RNA enthielt eine messbare

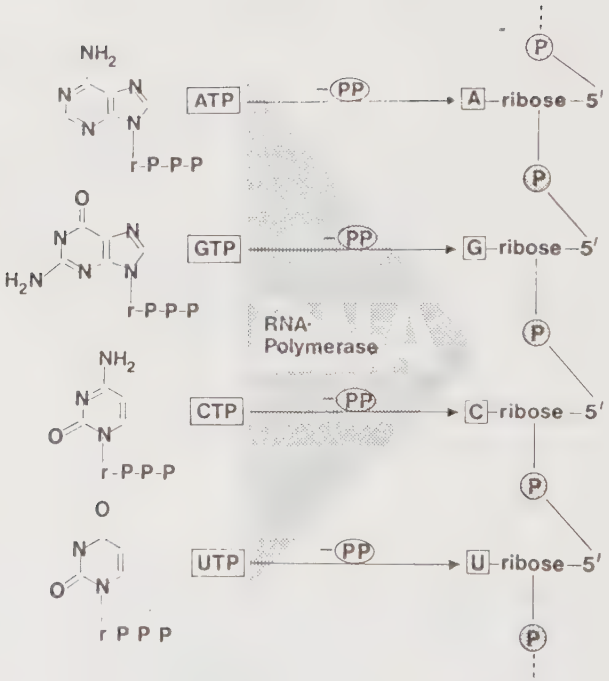


Abbildung 13

Bildung eines RNA-Moleküls aus den 4 Nucleosid-Triphosphaten nach der Matrize einer DNA mit Hilfe des Fermentes RNA-Polymerase.

Impulsrate. Da P^{32} ein stärkerer β-Strahler ist als C^{14}, sollte die Gabe natürlich so niedrig wie möglich gehalten werden (die Strahlungsenergie von P^{32} beträgt 1,71 mev, die von C^{14} zum Vergleich 0,159, also ungefähr $^1/_{10}$). Für die nachfolgenden Versuche wurden jedoch jeweils etwa 3 mCi/kg intravenös injiziert. Die RNA sollte nämlich nach den oben angegebenen Methoden, die zeitlich zum Teil sehr aufwendig sind, weiter untersucht werden. Die Halbwertzeit von P^{32} beträgt nur 14,3 Tage.

Bei dieser relativ hohen Dosierung ist durchaus mit Strahlenschäden zu rechnen. Bei etwa gleicher Dosierung betrug die Überlebenszeit bei erwachsenen Ratten etwa 14 Tage (NEUBERT et al., 71). Der Tod erfolgte durch Knochenmarksschädigung. Da die Einwirkungszeit in meinen Versuchen 10 Stunden nie überstieg, ist die Strahlenschädigung wahrscheinlich zu vernachlässigen. Toxizitätsuntersuchungen, die sich auf den Embryo beziehen, sind meines Wissens noch nicht gemacht worden.

P^{32} wird mit verschiedenen spezifischen Aktivitäten vom Handel angeboten. Da trägerfreies Phosphat mit der höchsten spezifischen Aktivität an Proteine adsorbiert werden könnte und dann der Einbau in die RNA stark behindert wäre, haben wir folgenden Versuch durchgeführt:

Bei einer Dosierung von 3 mCi/kg P^{32} erhielt die erste Gruppe von Versuchstieren trägerfreies Phosphat, die zweite 0,1 mg/ml Phosphat, die dritte 1,0mg/ml Orthophosphat. Das Ergebnis zeigt deutlich, daß trägerfreies Phosphat am geeignetsten ist, d.h., daß der Einbau bei Berücksichtigung der verschiedenen spezifischen Aktivitäten am höchsten ist. Das bezieht sich sowohl auf die Leber als auch auf 13 Tage alte Embryonen. Die Einwirkungsdauer betrug bei allen Tieren gleichmäßig 3 Stunden.

Zusammenfassung von C. a) und Diskussion:

Bei den vorher diskutierten Versuchen ging es uns darum festzustellen, welche für die Nucleinsäuren wichtigen Bausteine auf den Embryo in ausreichender Konzentration übergehen und somit als Precursoren zur Markierung embryonaler Zellkomponenten geeignet sind. Alle bisher genannten Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt:

Zusammenfassung: Brauchbarkeit der verschiedenen radioaktiv markierten Vorstufen zur Markierung von Nucleinsäuren in embryonalem Rattengewebe in vivo.

Vorstufe	geeignet zur Markierung von Nucleinsäuren im Embryo	Vorteile	Nachteile	empfohlene Dosierung
C^{14}-Orotsäure	nur bedingt		niedrige Markierung, teuer	mCi/kg
C^{14}-Uracil	nicht		fast keine Markierung	
C^{14}-Uridin	gut	gute Markierung der RNA	teuer	o,5 - 1,omCi/kg
C^{14}-Formiat	gut			
C^{14}-Asparaginsäure	nur bedingt		niedr. Markierung der RNA hohe Markier. von Protein	1,o mCi/kg
C^{14}-Glycin	nur bedingt		niedr. Markierung der RNA hohe Markier. von Protein	1,o mCi/kg
C^{14}-Bicarbonat	unbrauchbar		zu niedrige Markierung	
C^{14}-Glucose	sehr gut	Markierung aller Zellkomponenten, physiol.Vorstufe	hohe Markierung der Lipide	1,o mCi/kg
P^{32}	gut	physiol. Vorstufe	kurze Halbwertzeit	3,o mCi/kg

Dabei handelt es sich - mit Ausnahme des Phosphates - immer um C^{14}-markierte Verbindungen. Die Dosierung betrug in jedem Falle 1 mCi/kg. Die Einwirkungsdauer waren jeweils 3 Stunden. P^{32} wurde in einer Dosierung von 3 mCi/kg gegeben. Die Applikation erfolgte in jedem Falle durch intravenöse Injektion.

Die Werte lassen sich natürlich untereinander nur sehr schwer vergleichen, da die molaren Konzentrationen der Metaboliten im Plasma bzw. in den einzelnen Geweben außerordentlich verschieden sind. Ein direkter Vergleich zwischen Lebergewebe und embryonalem Gewebe hinsichtlich der Größe der Nucleinsäure-Synthese kann auf diese Weise ebenfalls nicht geführt werden, da die Aufnahme der einzelnen Substanzen in die jeweiligen Zellen durch die verschiedenen Barrieren (z.B. Placentarschranke) zu unterschiedlich ist. Zu einem echten Vergleich wäre es notwendig, die einzelnen "Pool-Größen" in den jeweiligen Geweben exakt zu bestimmen. Das aber ist wegen der Vielzahl der Metaboliten und der damit verbundenen methodischen Schwierigkeiten und dem Vorhandensein von Kompartments innerhalb der Zelle praktisch unmöglich. Das war zudem auch nicht das Ziel der vorhergehenden Versuche. Vielmehr sollte festgestellt werden, welche Substanzen auf den Embryo übergehen und als geeignete Precursoren in Frage kommen und mit welchen Stoffen die Nucleinsäuren ausreichend markiert werden können. Da die Substanzen für routinemäßige Untersuchungen am Nucleinsäurestoffwechsel dienen sollen, sind sehr teure Stoffe, wie etwa die Aminosäuren und die Orotsäure nur bedingt geeignet. Aus der Zusammenstellung kann man aber folgendes ersehen:

Sämtliche getesteten Stoffe gehen auf den Embryo über, besonders gut Formiat, Phosphat, Glucose und Uridin. Aminosäuren sind für Markierungsversuche im embryonalen Gewebe weniger gut geeignet,-Basen und Bicarbonat sind praktisch ungeeignet. Will man den Basenanteil in den Nucleinsäuren markieren, so empfiehlt es sich, Formiat oder das an der Base markierte Nukleosid zu applizieren.

Während man die RNA von Lebergewebe mit Orotsäure bei einer Dosierung von etwa 10 µCi/kg ausreichend und schnell markieren kann, muß man - um überhaupt Radioaktivität in embryonaler RNA festzustellen - etwa 1 mCi/kg applizieren. Bei so hoher Dosierung ist zu erwarten, daß die physiologische Konzentration im Blut rasch überschritten wird und somit keine "normalen" Bedingungen mehr vorherrschen. Es ist daher zu erwarten, daß bei Veränderungen der "Pool-Größen" und der Gleichgewichte Gegenreaktionen ausgelöst werden, die Rückwirkungen auf den Nucleinsäurestoffwechsel und damit auf alle anderen Stoffwechselvorgänge haben können.

Da es uns bei der Austestung von Pharmaka aber darauf ankommt, unter möglichst physiologischen Bedingungen zu arbeiten, scheint uns Orotsäure zur Markierung embryonaler RNA für routinemäßige Untersuchungen ungünstig zu sein.

Mit Formiat dagegen läßt sich embryonale RNA sehr gut markieren. Die Markierungsrate ist unter gleichen Bedingungen etwa fünfmal so hoch in embryonalen Zellen wie im Lebergewebe. Formiat ist allerdings nur zur Markierung der Purine, d.h. zur Untersuchung des Purinstoffwechsels der Embryonen geeignet. Hierbei dürfte es aber ein geeigneter und spezifischer Precursor sein.

Auch mit den zur Biosynthese der Pyrimidin- bzw. Purinbasen notwendigen Aminosäuren Asparaginsäure bzw. Glycin läßt sich embryonale RNA markieren. Man muß diese Substanzen aber in hohen - sicher unphysiologischen - Konzentrationen zuführen, um die Nucleinsäuren zu markieren. Es treten also hierbei ähnliche Schwierigkeiten auf, wie sie schon bei der Orotsäure diskutiert wurden.

Eine Markierung der RNA mit Uracil ist kaum möglich. Wahrscheinlich kann man allgemein sagen, daß sich embryonale Warmblüter-RNA mit Basen wie Uracil, Cytosin, Adenin, Guanin nicht in nennenswerter Weise markieren läßt. Die Basen werden entweder im Embryo nur sehr langsam in die entsprechenden Nucleotide umgewandelt oder - noch wahrscheinlicher - sie überwinden die Placentar-Barriere nur schwer.

Uridin - also das dem Uracil entsprechende Nucleosid - eignet sich zur Markierung embryonaler RNA dagegen vorzüglich. Unter unseren Standardbedingungen haben wir mit dieser Substanz die höchsten spezifischen Markierungen erhalten. Bei ähnlichen Versuchen zur Markierung der DNA mit Thymidin konnten wir feststellen, daß auch Thymidin gut auf den Embryo übergeht und die embryonale DNA relativ schnell und hoch markiert wird. Nucleoside, zumindest Pyrimidin-Nucleoside, sind also zur Markierung embryonaler Nucleinsäuren sehr gut geeignet, da sie einerseits schnell genug in das embryonale Gewebe penetrieren und andererseits relativ schnell aktiviert, d.h. phosphoryliert werden können. Der Nachteil besteht aber auch bei Verwendung dieser Substanzen darin, daß die physiologischen Konzentrationen sehr leicht überschritten werden und somit eine Verschiebung der Fließgleichgewichte eintritt.

Diese Bedenken entfallen bei der Verwendung radioaktiv markierter Glucose oder von radioaktiv markiertem Phosphat, da die entsprechenden Plasmakonzentrationen so hoch sind, daß bei Verwendung von trägerfreiem Phosphat oder von Glucose der spezifischen Aktivität von etwa 200 µCi/µmol die endogenen Konzentrationen an diesen Stoffen kaum erhöht wurden. Deshalb wurden diese beiden Substanzen für die weiteren Untersuchungen am Nucleinsäurestoffwechsel des embryonalen Gewebes herangezogen. Selbstverständlich haben diese Substanzen gewisse Nachteile, wie etwa kurze Halbwertzeit beim Phosphat, hohe Strahlungsenergie beim Phosphat, Vielzahl von metabolischen Zwischenstufen bei der Glucose-Umwandlung usw., aber im Ganzen gesehen überwiegen doch die Vorteile, wie etwa hohe Markierung im embryonalen Gewebe, Erhaltung der physiologischen Konzentrationen und Gleichgewichte. Es handelt sich hierbei auch um relativ preiswerte Substanzen.

Legt man für die Glucosekonzentration im Blut etwa 80 mg%, d.h. 80 mg/100 ml Blut zugrunde und berücksichtigt, daß eine Ratte etwa 5 ml Blut hat, so beträgt die Gesamtmenge an Glucose im Blut einer Ratte etwa 4 mg. Bei unserer Dosierung von 1 mCi/kg C^{14} markierter Glucose der spezifischen Aktivität von 200 µCi/µM bekommt eine etwa 200 g schwere Ratte 200 µCi Aktivität zugeführt. 200 µCi entsprechen 1 µmol und damit 180 µg. Der Gesamtglucosegehalt im Blut erhöht sich also von 4 mg auf 4,2 mg, d.h. von 80 mg% auf 85 mg%. Man bleibt bei der angegebenen Dosierung also immer im physiologischen Konzentrationsbereich. Eine Veränderung der physiologischen Gleichgewichte ist damit völlig ausgeschaltet. Auch die Konzentrationen aller Metaboliten, die aus Glucose entstehen, können daher nicht verändert sein. Dies erscheint uns als ein großer Vorteil bei der Wahl von Glucose als Precursor.

Die Anwendung der Glucose als Vorstufe kann jedoch auch einen Nachteil haben. Man erreicht sicher keine "Puls"-Markierung, sondern wegen der besonderen Verhältnisse der Blutglucose gleicht die intravenöse Injektion einer Dauerinfusion.

Da für Messungen des Umsatzes bestimmter Zellkomponenten die Abfallrate der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit sehr viel interessanter und eindeutiger ist als die Veränderung der Markierungsrate auf dem ansteigenden Schenkel - weil Permeabilitätsfaktoren und andere störende Größen ausgeschlossen werden - ist eine Markierung von Zellbestandteilen mit Glucose für Bestimmungen

des Umsatzes schlecht geeignet. Denn erst nach einem Zeitraum von mehr als 10 Stunden beginnt die spezifische Aktivität in der RNA wieder abzunehmen. Für die Untersuchung des Umsatzes ist daher eine Markierung mit Uridin oder Formiat - trotz der bereits diskutierten Nachteile - besser geeignet.

Zudem wird die spezifische Aktivität der injizierten Glucose schlagartig durch die Blutglucose verdünnt. Nach einer Überschlagsrechnung ist die spezifische Aktivität im Blut 10 µCi/µmol, wenn eine spezifische Aktivität von 200 µCi/µmol injiziert wird (1 mCi/kg). Das ist eine Verdünnung 1 : 20.

Bei Applikation von trägerfreiem Phosphat ist ebenfalls nicht damit zu rechnen, daß die physiologische Konzentration überschritten wird. Die Tabelle 3 zeigt Bestimmungen über den Gehalt an Phosphor in 100 ml Blut (ca. 6 - 7 mg%) bei einer Ratte.

Legen wir eine mittlere Konzentration von anorganischem Phosphat im Plasma von 6 mg% zugrunde, so beträgt die Konzentration, auf P bezogen, etwa 2mg/100 ml Blut. Berücksichtigt man, daß die Ratte etwa 5 ml Blut enthält, so beträgt die Gesamtmenge von P im Gesamtblut der Ratte 100 µg. Die maximale spezifische Aktivität beträgt für P^{32} 9,2 x 10^6 µCi/Grammatom, d.h. 9,2 x 10^6 mCi/32 mg P. 3 mCi würden dementsprechend 3,3 x 10^{-6} mg P enthalten. Das hieße, daß einem Tier weniger als 1 ng P zugeführt würde, womit die Konzentration an P praktisch nicht erhöht wird (BAYLY und EVANS 2). Abgesehen davon, daß ein höherer Einbau erzielt wird, ist also das trägerfreie Phosphat auch deshalb vorzuziehen, weil die physiologischen Konzentrationen nicht beeinflußt werden.

Die Aufarbeitung der untersuchten Gewebe erfolgte nicht nur mit der Phenolmethode, sondern auch nach unserer Säure-Laugen-Extraktions-Methode. Diese Methode hat den Vorteil, daß sie nicht nur die Markierung in den Nucleinsäuren, sondern auch in den Lipoiden u nd Proteinen angibt. Vergleicht man die Höhe der Markierungsraten nach Phenolextraktion und Gradientenzentrifugation in der ribosomalen RNA mit der Markierung in der RNA der PCS-Extraktion, so ist in wesentlichen Punkten eine sehr gute Übereinstimmung festzustellen. Im allgemeinen ist jedoch zu sagen, daß die Werte nach der PCS-Methode immer etwas höher liegen als die nach Phenol-Extraktion und anschließender Gradienten-Zentrifugation. Das mag daran liegen, daß man bei der PCS-Extraktion die Gesamt-RNA bestimmt, die eine Markierung in der messenger- und der transfer-RNA mit beinhaltet, sowie eine Markierung in der Zellkern- und Mitochondrien-RNA.

Tabelle

Bestimmungen von anorganischem Phosphat im Rattenserum

I	6,2 mg%	IV	7,1 mg%	VII	6,6 mg%	X	6,1 mg%
II	6,3 mg%	V	6,8 mg%	VIII	6,3 mg%	$\bar{M}$	6,36 mg%
III	6,2 mg%	VI	6,2 mg%	IX	5,8 mg%		

Für diese Bestimmungen wurde die Biochemica-Test-Combination der Firma Boehringer-Mannheim benutzt. Das Serum ist vor der Bestimmung enteiweißt worden. Jede römische Ziffer stellt Doppelbestimmungen vom Serum eines Tieres dar.

Vergleich der spez. Aktivität in der RNS bei Anwendung verschiedener C^{14}-markierter Praecursoren zwischen Phenolmethode und Säureextraktion nach Ogur-Rosen in dpm/γ RNA

	Phenol-Extraktion				Ogur-Rosen-Methode	
	28 S		18 S			
	Leber	Embryonen	Leber	Embryonen	Leber	Embryonen
Orotsäure	370	2,3	270	1,5	480	2,9
Formiat	5,8	31	4,7	17	7,6	20
Uracil	0	4,5	≈0,5	5,9	2,2	4,4
Uridin	7,1	68	6,8	46	7,9	45
Asparaginsäure	0	7,8	0	6,7	1,1	7,7
Glycin	≈0,6	5,2	≈0,6	4,2	2,8	6,3
Glucose	1,5	33	1- 1,5	28-33	3,4	33

Der RNS-Gehalt wurde bei Anwendung der Phenolmethode nach der Gradientenzentrifugation aus der O.D. bestimmt, dabei wurde für eine Extraktion von 1,0000 = 40 γ RNS zugrundegelegt. Bei Anwendung der Ogur-Rosen-Säureextraktion wurde die RNA nach der Orcin-Methode bestimmt.

Tabelle

	Phenol-Extraktion		Ogur-Rosen-Methode			
	28 S spezif. Aktiv.	18 S spezif. Aktiv.	spezif. Aktiv.	Σ dpm/µg DNA^{-1}	% säurelösl.	% säureunlösl.
Embryo	50	46	28	59	27-29	73-71
Leber	43	41	32	1950	21-33	79-67

Die Tabelle zeigt einen Vergleich der spezifischen Aktivitäten im 28 S bzw. im 18 S Peak der ribosomalen RNA mit Werten der Gesamt-RNA, die mit der Säure-Laugen-Fraktionierung gewonnen wurde. Außerdem ist die Summe der Zerfälle aus allen Fraktionen, auf DNA bezogen, im rechten Teil der Tabelle angegeben. Auf Lebergewebe ist 33 mal soviel P^{32} übergegangen wie auf Embryonalgewebe. Trotzdem ist der Einbau in die RNA in Leber und Embryonen nach beiden Methoden etwa gleich hoch. Die Muttertiere erhielten 3 mCi P^{32}/kg intravenös 3 Stunden vor Beginn der Untersuchungen injiziert. Die Embryonen waren 13 Tage alt.

4 1a

b) Ermittlung der Gesamtradioaktivität, die vom Muttertier auf den Embryo übergegangen ist (Beurteilung der Barriere zwischen Mutter und Embryo)

Für die Beurteilung von Einbauraten unter pharmakologischen Bedingungen ist es wichtig, eine Information über die Menge an radioaktiver Substanz zu besitzen, die auf den Embryo übergegangen ist. Wie bereits ausführlich diskutiert, stellt die Placentarschranke einen Faktor dar, der einen erheblichen Einfluß auf das Ausmaß des Einbaues eines Precursors in Komponenten der embryonalen Zellen ausüben kann. Wir haben daher versucht, durch Messung der gesamten Radioaktivität, die unter unseren Versuchsbedingungen auf den Embryo übergegangen ist, eine zusätzliche Information zu erhalten.

Falls die Placentarschranke unter bestimmten experimentellen Bedingungen eine geringere Menge der radioaktiven Vorstufe hindurch läßt, wäre eine ganz allgemeine Verminderung des Einbaues in alle gemessenen Zellfraktionen zu erwarten. Dies würde sich in der Summe der Radioaktivität bemerkbar machen, die im embryonalen Gewebe gefunden wird. Eine solche Verminderung der Gesamtradioaktivität könnte daher auf eine gestörte Placentarfunktion hinweisen.

Es ist allerdings zu bedenken, daß eine allgemeine Verminderung der auf den Embryo übergetretenen Radioaktivität auch das Resultat einer Stoffwechselstörung in den embryonalen Zellen repräsentieren kann, die auf einer zentralen und frühen Stufe nach dem Durchtritt durch die Zellmembran lokalisiert ist.

So ist beispielsweise im Falle der Glucose bekannt, daß in der Zelle kaum freie Glucose vorkommt, da die Substanz praktisch sofort nach dem Eintritt in die Zelle in Glucose-6-Phosphat (G-6-P) umgewandelt wird, das wiederum schnell weiter umgesetzt wird. Eine Stoffwechselstörung, die zu einer gestörten Bildung oder einer gestörten Umsetzung von G-6-P führt, könnte daher durchaus einen Einfluß auf die Permeation weiterer Glucose-Moleküle durch die Zellmembran ausüben und eine gestörte Placentarfunktion vortäuschen.

Für eine Aufschlüsselung der Radioaktivität, die auf den Embryo übergegangen ist und die sich in säurelöslicher oder säureunlöslicher Form vorfindet, eignet sich am besten die Methode der Säure-Laugen-Fraktionierung. Bei dieser Art der Fraktionierung wird einmal die Radioaktivität vollständig erfaßt; andererseits kann durch Aufschlüsselung der einzelnen Komponenten ein Hinweis darauf erhalten werden, in welche Zellbestandteile der Precursor bevorzugt eingebaut wird.

Die Ergebnisse, die mit den einzelnen C^{14}-markierten Precursoren gewonnen wurden, sind in der Tabelle 6 zusammengestellt. Um überhaupt einen Vergleich zu erhalten, sind die für den Embryo gewonnenen Daten entsprechenden Werten für Lebergewebe gegenübergestellt. Es fällt auf, daß die Summe der in 3 Stunden in die Zelle eingetretenen Radioaktivität bei der Leber fast immer größer ist als bei embryonalem Gewebe. Bezieht man die Radioaktivität auf DNA, d.h. führt man eine Überschlagsrechnung über die Menge des Precursors durch, die auf eine bestimmte Zellzahl übergegangen ist, so erkennt man, daß der Unterschied im Falle der Orotsäure mehrere Zehnerpotenzen beträgt. Offenbar erfolgt der Übergang in die Leber sehr viel leichter als in den Embryo. Dies mag auf die Placentarbarriere zurückzuführen sein.

Es muß aber betont werden, daß die Aufnahme des radioaktiv markierten Precursors in verschiedenen Geweben nicht direkt vergleichbar ist - selbst unter der Voraussetzung, daß allen Zellen vom Blut her nach intravenöser Injektion eine gleiche spezifische Aktivität der Vorstufe angeboten wird. Der Übergang der radioaktiv markierten Substanz hängt für jedes Gewebe in spezifischer Weise von Faktoren wie der Durchblutungsgröße, Permeabilitätsfaktoren und unter Umständen von Stoffwechselbesonderheiten der betreffenden Zellen ab. Mehrfachbestimmungen ergaben jedoch, daß für dasselbe Gewebe die Menge der übergegangenen Radioaktivität relativ konstant ist und daß es durchaus möglich ist, diesen Faktor als experimentelle Größe zu benutzen.

Bei einem Vergleich des Überganges radioaktiv markierter Vorstufen auf Embryo und Leber ist interessant, daß sich die einzelnen von uns benutzten Vorstufen durchaus verschieden verhalten.
Während die O r o t s ä u r e , die als brauchbare Vorstufe zur Markierung von Nucleinsäuren in der Leber bekannt ist, sich in einer fast 500 mal größeren Menge in der Leberzelle findet als im embryonalen Gewebe, beträgt der Unterschied beim F o r m i a t und bei der A s p a r a g i n s ä u r e nur etwa eine Zehnerpotenz. Er liegt im Falle des G l y c i n s ungefähr 30 mal höher und beim U r a c i l bei beiden Geweben etwa in der gleichen Größenordnung. Berücksichtigt man weiterhin, daß von der auf den Embryo übergegangenen Menge etwa 70 % in säureunlöslicher Form, d.h. zum überwiegenden Teil in die Nucleinsäuren eingebaut ist, im Lebergewebe aber "nur" etwa 40 %, so läßt sich hier ein besonders großer Unterschied zwischen diesen beiden Geweben erkennen. Besonders interessant

Verteilung verschiedener C^{14}-markierter Praecursoren auf säurelösliche und säureunlösliche Fraktionen in Embryo und Leber

Tab. 6

	Embryo, 13 Tage				Leber			
	Σdpm/γDNA	Σdpm übergegangen in 3 Stunden	Säurelösl.	Säureunlösl.	Σdpm/γDNA	Σdpm übergegangen in 3 Stunden	Säurelösl.	Säureunlösl.
Orotsäure *	27,2 29,2	17 800 17 600	84,9 % 85,2 %	15,1 % 14,8 %	130 000 129 000	2160 000 2110 000	76,4 % 75,5 %	23,6 % 25,0 %
Formiat	52,3 61,0	42 300 44 400	31,8 % 30,0 %	68,2 % 70,0 %	575 745	122 000 122 000	26,1 % 25,3 %	73,9 % 74,7 %
Uracil	17,7 20,4	7 560 7 700	52,8 % 47,7 %	47,2 % 52,3 %				
Uridin	71,0 82,7	27 500 32 200	28,4 % 27,3 %	71,6 % 72,7 %	26,9 27,5	171 000 174 800	68,4 % 70,3 %	31,6 % 29,7 %
Asparaginsäure	95,0 70,0	33 300 27 000	43,0 % 39,5 %	57,0 % 60,0 %	660 638	96 200 100 000	38,0 % 36,2 %	62,0 % 63,8 %
Glycin	84,5	33 500	37,6 %	63,4 %	3 300 2 500	430 000 460 000	45,4 % 43,6 %	54,6 % 56,4 %
Glucose	167 185	127 000 152 000	47,0 % 44,2 %	53,0 % 55,8 %	146 146	120 000 122 000	66,9 % 66,3 %	33,1 % 33,7 %

* In diesem Falle wurden die Aether-Alkohol-, Benzol- und Aetherwaschungen als säurelösliche Fraktionen ausgewertet, da Orotsäure mit 0,2 n PCS nicht quantitativ entfernt worden ist.

Ausgewertet wurden folgende Fraktionen:

I. 1. Extrakt. mit 0,2 n PCS
   2. Extrakt. mit 0,2 n PCS
II. 1. u. 2. Aether-Alkohol 1 : 3
III. Benzol
IV. Aether
V. RNS-Extrakt. in 1 n PCS
VI. DNS-Extrakt. in 75° C 1 n PCS
VII. Protein-Sediment

erscheint in diesem Zusammenhang das Uridin, das in die embryonale Zelle in einer etwas größeren Menge übergeht, als dies beim Lebergewebe gemessen werden kann. Die Versuche zeigen, daß die Relationen des Überganges einer radioaktiv markierten Vorstufe auf Leberzelle bzw. embryonale Zelle in einem Bereich von drei Zehnerpotenzen schwanken können. Es ist anzunehmen, daß bei einer Substanz mit einem besonders hohen Faktor die Permeabilität in die Zelle den limitierenden Schritt darstellt und daß es kaum möglich sein wird, mit einer solchen Substanz Messungen von Stoffwechselgrößen innerhalb der Zellen durchzuführen.

Der Hauptzweck dieser Versuchsreihe war es, rein praktisch einen Überblick darüber zu bekommen, welche radioaktiv markierten Vorstufen als Precursoren für Stoffwechselmessungen am embryonalen Gewebe geeignet sind. Die Beurteilung dieser Frage muß nach zwei Kriterien erfolgen: Einmal interessiert natürlich, welche Substanzen in besonders großer Menge auf die embryonale Zelle übergehen, da bei solchen Verbindungen vermutet werden kann, daß bei Einbaustudien die Permeabilität nicht den limitierenden Faktor darstellt und daher die Messung von Stoffwechselgrößen möglich wird.
Die zweite Frage ist jedoch die, welche Mengen radioaktiv markierter Vorstufen injiziert werden müssen, um eine zuverlässige Messung der Radioaktivität in den verschiedenen Zellkomponenten zu gestatten. Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden alle verwandten Vorstufen in einer Menge von 1 mCi/kg injiziert und die Radioaktivität nach 3 Stunden gemessen. Aus der Tabelle ist ebenfalls zu erkennen, daß die unter diesen Bedingungen in die Embryonal- bzw. Leberzelle übergegangene gesamte Radioaktivität außerordentlich verschieden ist. Die Orotsäure, bei der unter diesen Versuchsbedingungen nur eine Aktivität von etwa 25 dpm/µg DNA nachgewiesen werden kann, scheidet für Stoffwechseluntersuchungen an embryonalem Gewebe praktisch aus. Auch die Aktivität des Uracils ist so niedrig (21 dpm/µg DNA), daß die Verbindung als Precursor für Routineuntersuchungen nicht in Frage kommt. Formiat, Uridin, Asparaginsäure und Glycin können im embryonalen Gewebe nach intravenöser Gabe von 1 mCi/kg in einer Menge von etwa 80 dpm/µg DNA wiedergefunden werden.

Das Bicarbonat ist schon im vorigen Abschnitt diskutiert worden. Es fügt sich in die hier aufgeführten Substanzen insofern gut ein, als keine wesentlichen Unterschiede zwischen Leber und Embryogewebe nachgewiesen werden können. Es ist, ebenso wie das Uracil, wegen der zu niedrigen Gesamtaktivität als Precursor für Routineuntersuchungen nicht zu benutzen.

Bei P h o s p h a t beträgt der Unterschied zwischen embryonalem und Lebergewebe wieder etwa eine Zehnerpotenz, wenn man die Summe der säureunlöslichen Fraktionen berücksichtigt. Beim Embryo beträgt die Anzahl der Zerfälle - auf DNA bezogen - etwa 40, in der Leber, die jedoch relativ starke Streuungen aufweist, etwa 500 dpm/µg DNA. Da das Phosphat zu einem großen Teil in den Nucleinsäurefraktionen eingebaut wird, eignet es sich als Precursor für Routineuntersuchungen sehr gut.

Von allen hier untersuchten Stoffen zeigt G l u c o s e die höchste spezifische Aktivität im embryonalen Gewebe. Dies ist aus der Tabelle deutlich zu erkennen. Während die Gesamtradioaktivität aller untersuchten Stoffe unter 100 dpm/µg DNA liegt, teilweise sogar beträchtlich darunter, gilt dies nicht für Glucose. Die Gesamtradioaktivität ist mit 550 dpm/µg DNA etwa siebenmal höher als die nach Gabe von Asparaginsäure, Glycin und Uridin - Stoffen, die auf den Embryo an sich recht gut übergehen. Bei der hohen Stoffwechselleistung von Embryonen ist zu erwarten, daß Glucose in beträchtlichen Mengen in säureunlösliche Fraktionen eingebaut wird. In dem zum Vergleich untersuchten Lebergewebe betrug die Gesamtradioaktivität etwa nur $^1/_4$ vom embryonalen Gewebe. Auch die spezifische Aktivität der säureunlöslichen Fraktionen - auf DNA bezogen - ist etwa 5 : 1. Mit 95 dpm/µg DNA in den säureunlöslichen Fraktionen (Summe der säureunlöslichen Fraktionen) stellt Glucose den besten Precursor für routinemäßige Stoffwechseluntersuchungen an embryonalem Gewebe dar. Wie später gezeigt wird, werden sämtliche säureunlöslichen Zellkomponenten, nämlich Lipide, RNA, DNA und Proteine, in ausreichend hohem Maße markiert.

Da das Verteilungsmuster des Einbaues bei den einzelnen hier diskutierten Vorstufen durchaus verschieden ist, steht uns mit diesen Substanzen ein Spektrum von Metaboliten zur Verfügung, die je nach der zu untersuchenden Fragestellung eingesetzt werden können. Da Uridin, Asparaginsäure und Glycin vergleichsweise teuer sind, eignen sich diese Vorstufen kaum für Routineuntersuchungen. Derartige Versuchsreihen sind jedoch mit Formiat, P^{32} und Glucose durchaus möglich. Deshalb wurden diese radioaktiv markierten Verbindungen in den folgenden Untersuchungen bevorzugt benutzt und der Einbau genauer analysiert.

c) Verteilung der Radioaktivität auf säurelösliche und säureunlösliche Fraktionen.

In der Tabelle 6 ist die Verteilung der Radioaktivität in embryonalen und in Leberzellen wiedergegeben. Auch bei einer solchen Untersuchung lassen sich erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Geweben nachweisen. Diese Unterschiede beziehen sich - mit Ausnahme vom Uridin - jedoch nur auf die Gesamtradioaktivität, die auf die einzelnen Gewebe übergegangen ist. Vergleicht man dagegen den Prozentsatz der Verteilung auf die säurelöslichen bzw. säureunlöslichen Fraktionen, so verwischen sich die Unterschiede. Aufgrund des wesentlich größeren Angebotes ist auch die absolute Einbaurate in die säureunlöslichen Fraktionen bei der Orotsäure im Lebergewebe wesentlich höher als beim embryonalen Gewebe. So wurden bei Gabe von 1 mCi/kg in der säureunlöslichen Fraktion von Lebergewebe 3.200 dpm/µg DNA, dagegen aber nur 4,2 dpm/µg DNA im Embryonalgewebe gefunden. Betrachtet man die prozentuale Verteilung auf die säureunlöslichen bzw. säurelöslichen Fraktionen, so ergibt sich für Lebergewebe 75 % in der säurelöslichen und 25 % in der säureunlöslichen Fraktion, während das Verhältnis beim Embryonalgewebe 83 % zu 17 % beträgt. Aus der Tabelle 6 ist zu ersehen, daß aber nicht alle Precursoren wie die Orotsäure nach einmaliger Gabe und in dem von uns untersuchten Zeitintervall hauptsächlich in der säurelöslichen Fraktion zu finden sind.

Für Formiat beispielsweise ist festzustellen, daß es zum größten Teil, nämlich zu etwa 70 % im Embryonalgewebe bzw. mit 75 % im Lebergewebe in den säureunlöslichen Zellbestandteilen vorkommt. Auch hier macht aber der Unterschied in der Einbaurate zum Lebergewebe eine Zehnerpotenz aus. Die Einbaurate in embryonales Gewebe ist mit ungefähr 40 dpm/µg DNA recht hoch.

Das gleiche gilt für die Aminosäuren Asparaginsäure und Glycin, die ebenfalls zu etwa 60 % in den säureunlöslichen Fraktionen wiedergefunden werden. Der prozentuale Anteil im Lebergewebe beträgt in den säureunlöslichen Fraktionen ebenfalls etwa 60 %. Die gesamte Radioaktivität ist aber im Lebergewebe in den säureunlöslichen Fraktionen etwa zehnmal so hoch bei der Asparaginsäure bzw. dreißigmal so hoch im Falle des Glycins. Die Markierungsrate im Embryonalgewebe von ungefähr 50 dpm/µg DNA ist jedoch noch verhältnismäßig hoch, so daß sich die beiden Aminosäuren ganz gut zur Markierung der säureunlöslichen Fraktionen eignen.

Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt wurde, geht bei Verwendung von Uracil und Bicarbonat als Precursoren aus der Gesamtradioaktivität hervor, daß diese Stoffe für routinemäßige Untersuchungen ungeeignet sind. Obwohl 50 % der Gesamtradioaktivität in den säureunlöslichen Fraktionen gefunden werden, ist

ist die absolute Zählrate zu gering. U r i d i n ist schon im vorigen Kapitel als guter Precursor hervorgehoben worden. An diesem Beispiel ist der Unterschied zwischen Lebergewebe und embryonalem Gewebe besonders deutlich zu demonstrieren. Zwar liegt die Gesamtradioaktivität in Leber und Embryo in etwa der gleichen Größenordnung, nämlich zwischen 70 und 80 dpm/µg DNA, im Gegensatz zu den anderen hier getesteten Precursoren weist Uridin jedoch einen recht großen Unterschied in der Verteilung auf die säurelöslichen und säureunlöslichen Fraktionen bei Embryo bzw. Lebergewebe auf: So wird das Uridin im Embryo zu einem doppelt so hohen Prozentsatz in säureunlösliche Fraktionen eingebaut, wie im Lebergewebe:

Embryo säurelöslich: säureunlöslich 30 : 70
Leber säurelöslich: säureunlöslich 60 : 40 etwa.

Im vorigen Kapitel wurde auch schon auf die hervorragende Stellung der G l u c o s e hingewiesen. Zwar wird die Glucose etwas weniger in die säureunlöslichen Komponenten beim Embryo eingebaut als vergleichsweise bei der Leber (28 % bzw. 34 %), aber die Gesamtaktivität in den säureunlöslichen Fraktionen ist doch mit 95 dpm/µg DNA besonders hoch.

Auch auf den großen Unterschied zwischen Leber und embryonalem Gewebe bei Verwendung von P^{32} als Precursor wurde schon hingewiesen. Die Gesamtradioaktivität war bei P^{32} in der Leber dreißigmal höher als im Embryo. Dies ist ebenfalls der Fall, wenn man die säureunlöslichen Fraktionen miteinander vergleicht. Trotzdem ist aber P^{32} zu einem hohen Prozentsatz, nämlich zu 72 %, in der säureunlöslichen Fraktion im embryonalen Gewebe vorhanden. Dadurch ist es als Precursor sehr gut zu verwenden.

Vergleicht man die in der Tabelle 6 aufgeführten Werte miteinander, so lassen sich die hier verwendeten Precursoren nach folgenden Gesichtspunkten ordnen: Orotsäure, Uracil und Bicarbonat sind als Precursoren ungeeignet, da sie nur wenig auf den Embryo übergehen und zum größten Teil in die säureunlöslichen Fraktionen nicht eingebaut werden.
Asparaginsäure, Glycin und Uridin dagegen eignen sich besonders gut, die Aktivität im Embryo ist bei Uridin höher als in der Leber. Bei Verwendung von Glucose liegen mehr als $^2/_3$ der Aktivität in der säurelöslichen Fraktion vor. Trotzdem ist die Markierung in der säureunlöslichen Fraktion bei weitem am höchsten.

d) Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Komponenten der säureunlöslichen Fraktion.

Der Vorteil der PCS-Laugen-Extraktion besteht nicht nur darin, daß sie schnell zuverlässige Werte ergibt, sondern daß man auch eine Übersicht über die Verteilung der Radioaktivität innerhalb der einzelnen säureunlöslichen Fraktionen erhält. Wir haben daher diese Methode in den letzten Jahren in unserer Arbeitsgruppe weiter ausgebaut und den speziellen Bedürfnissen unserer Fragestellung angepaßt. Bei der hier angewandten Methode treten nur geringe Überschneidungen innerhalb der einzelnen Zellfraktionen auf. Eine Unterteilung in folgende Zellkomponenten ist möglich:

Lipoide,
Ribonucleinsäuren,
Desoxy-Ribonucleinsäuren,
Proteine.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 14 wiedergegeben. Da die absoluten Impulsraten bei einem derartigen Vergleich wenig aussagen, erfolgte die Aufschlüsselung in Prozenten.

O r o t s ä u r e wird - wie zu erwarten war - ganz überwiegend in die Nucleinsäure-Fraktionen eingebaut. Warum ein geringer Prozentsatz der Radioaktivität auch in der Proteinfraktion gefunden wird, ist schwer zu erklären. Eine Verunreinigung dieser Fraktion mit kleinen Mengen DNA kann nicht ganz ausgeschlossen werden.
Ein deutlicherer Unterschied zwischen Embryo und Leber ergibt sich bei der Verwendung von F o r m i a t . Bei der Leber wird der Hauptteil dieser Substanz in die Protein- und die Lipidfraktion eingebaut (90 %). In der Nucleinsäure-Fraktion finden sich hingegen nur 10 % der Radioaktivität. Beim embryonalen Gewebe finden sich völlig andere Verhältnisse. Hier werden 50 - 60 % in die Nucleinsäuren eingebaut und der Anteil in Proteinen und Lipiden beträgt nur etwa 40 - 42 %.

Eigenartigerweise findet sich auch bei Anwendung von U r a c i l ein nicht unerheblicher Prozentsatz der Radioaktivität außerhalb der Nucleinsäuren. Offenbar wird die Verbindung in den 3 Stunden der Versuchszeit zu einem erheblichen Prozentsatz abgebaut, so daß die Metaboliten in den Lipid- und Proteinstoff-

wechsel eingehen können. Im ganzen gesehen sind die gezählten Impulsraten sowohl in der Leber als auch im embryonalen Gewebe jedoch so niedrig, daß dem Befund keine größere Bedeutung zukommt.
Auch nach Injektion von Uridin findet sich ein gewisser Prozentsatz der Radioaktivität in den Proteinen und Lipiden. Jedoch wird in diesem Falle der Hauptanteil der Markierung sowohl in Leber (65 - 68 %) als auch im Embryo (83 - 85 %) in den Nucleinsäuren wiedergefunden.

Deutlichere Unterschiede zwischen Leber und embryonalen Zellen erkennt man hingegen wieder bei den Versuchen mit radioaktiv markierten Aminosäuren. Beim Lebergewebe werden 95 - 96 % der säureunlöslichen Radioaktivität in den Proteinen und Lipiden wiedergefunden. Der Anteil der Radioaktivität in den Nucleinsäuren der Leber beträgt nur 4 %. Dagegen sind bei den gleichen Versuchstieren im embryonalen Gewebe 23 - 24 % nach Injektion von Asparaginsäure und 20 % nach Gabe von Glycin in die Nucleinsäure-Fraktion eingebaut. Beim embryonalen Gewebe eignen sich also diese beiden Aminosäuren durchaus als Vorstufen zur Markierung von Nucleinsäuren.
Bei P^{32} und Glucose wurde die RNA - wie bereits im Kapitel B) Methoden erwähnt - vor den Lipiden extrahiert. P^{32} findet sich - wie zu erwarten - beim Lebergewebe zu 87 bis 88 % in der Lipidfraktion und zu etwa 12 bis 13 % in der Nucleinsäurefraktion. Eine Markierung in der Proteinfraktion ist - wie zu erwarten war - praktisch nicht vorhanden (weniger als 0,1 %). Beim Embryo dagegen sieht das Verteilungsmuster ganz anders aus: Die Lipidfraktion weist nur eine Markierungsrate von 20 bis 23 % auf, DNA- und RNA-Fraktionen zusammen ergeben fast 80 % der Gesamtradioaktivität in den säureunlöslichen Fraktionen. Auch hier ist die Proteinfraktion praktisch nicht markiert.

Nach Gabe von Glucose* sind sämtliche säureunlöslichen Fraktionen radioaktiv markiert. Der Anteil der Markierung in den Nucleinsäuren beträgt beim Embryo hier 45 % und bei der Leber 30 %.

Die zu dieser Fragestellung durchgeführten Versuche ergeben natürlich nur eine Momentaufnahme aus dem Stoffwechsel. Die Experimente wurden bewußt auf 3 Stunden beschränkt. Es ist zu erwarten, daß sich die Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Fraktionen des säureunlöslichen Anteils durchaus in zeitlicher Abhängigkeit verschiebt. Diese Versuche dienten jedoch vor allem dem Zweck, einen Anhalt darüber zu erhalten, welche radioaktiv markierten Precursoren zur Markierung bestimmter Zellkomponenten geeignet sind.

Verteilung der Radioaktivität auf die säureunlöslichen Fraktionen nach Markierung in vivo

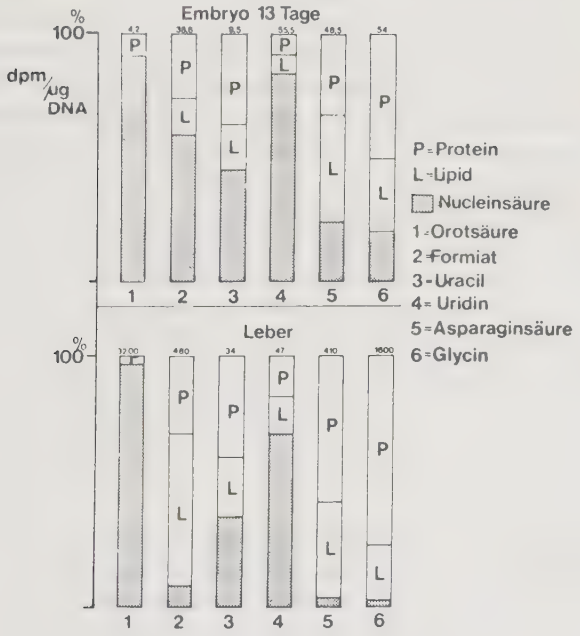


Abbildung 14

Alle in der Abbildung erwähnten Vorstufen wurden in C^{14}-markierter Form schwangeren Ratten am Tag 13 der Schwangerschaft intravenös in einer Dosis von 1 mCi/kg (Orotsäure 0,8 mCi /kg) injiziert. 3 Stunden nach der Injektion wurden Embryonen sowohl kleine Leberstücken herauspräpariert und nach dem Säure-Laugen-Extraktionsverfahren (s. Methodik) aufgearbeitet. Die Zahlen über den Säulen stellen die dpm/µg DNA in der Summe der säureunlöslichen Fraktionen dar. Zur besseren Übersicht wurde die Verteilung auf die Hauptkomponenten der Zelle in % angegeben. Die Nucleinsäure-Fraktion gibt die Summe der RNA + DNA-Werte wieder. In diesen Versuchsreihen erfolgte die RNA-Extraktion vor der Lipidextraktion. Die RNA-Werte könnten bei hoher Markierung der Lipide etwas zu hoch ausfallen.

e) Versuche über den Einbau verschiedener radioaktiver Vorstufen in vitro.

Bei den Experimenten in vivo müssen sehr hohe Mengen Radioaktivität injiziert werden, um eine genügende Markierung in den entsprechenden Geweben zu erreichen. Darüber hinaus sind die Versuchsbedingungen bei Verwendung der verschiedenen Vorstufen deshalb sehr verschieden, weil die experimentelle Anordnung in einigen Fällen einer Pulsmarkierung nahe kommt, während in anderen Fällen nahezu Bedingungen einer Dauerinfusion erreicht werden. Wie bereits ausgeführt, spielt bei den Versuchen in vivo weiterhin die Placentarschranke in vielen Fällen eine entscheidende Rolle. Es wurden daher zur Ergänzung Versuche durchgeführt, in denen die herauspräparierten, intakten Embryonen in vitro mit den entsprechend radioaktiv markierten Vorstufen entweder in modifizierter Ringer-Lösung oder in Serum inkubiert wurden.

Diese Experimente erlauben einmal einen gewissen Vergleich mit den in vivo durchgeführten Versuchen. Zum anderen bieten sie die Möglichkeit, den Stoffwechsel von Embryonen unter Ausschaltung der Placentarschranke in vitro zu verfolgen und so z. B. den Effekt einer Vorbehandlung in vivo mit bestimmten Pharmaka zu untersuchen.

Um einen Überblick über den Einbau der radioaktiv markierten Vorstufen in die verschiedenen Zellkomponenten zu erhalten, wurde wieder die Säure-Laugen-Fraktionierung benutzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen ☛ 28 zusammengestellt. Die Versuchsanordnung besitzt den großen Vorteil, daß man mit sehr viel geringeren Radioaktivitätsmengen auskommen kann, als bei in-vivo-Versuchen. Wie die Daten in den Abbildungen 28 zeigen, können derartige in-vitro-Versuche mit embryonalem Gewebe über einen Zeitraum von 3 Stunden ausgedehnt werden. Durch Wechsel des Versuchsmediums können die Bedingungen einer echten Pulsmarkierung erreicht werden. Entsprechende Versuche können mit der Methode der Säure-Laugen-Fraktionierung bereits dann durchgeführt werden, wenn sich in einem Versuchsansatz 5 - 7 Embryonen vom Tag 11, bzw. 2 - 3 Embryonen vom Tag 12 oder 13 befinden.

f) Versuche über den Einbau verschiedener radioaktiv markierter Vorstufen in ribosomale RNA in vivo.

Der Hauptanteil dieser Dissertation wurde der Frage gewidmet, ob es möglich ist, mit Hilfe der bereits erwähnten radioaktiv markierten Vorstufen den Nucleinsäurestoffwechsel embryonalen Gewebes zu untersuchen. In den folgenden Abschnitten wird daher über Versuche berichtet, die zum Ziele hatten, die radioaktiv markierten Nucleinsäuren näher zu charakterisieren und eine Kinetik der radioaktiven Markierung zu erhalten. Es kam bei diesen Experimenten zunächst einmal besonders darauf an, die Markierung einer klar definierbaren Nucleinsäure zu verfolgen.

Der Begriff Ribonucleinsäuren umfaßt zahlreiche Komponenten, die sich recht erheblich sowohl in ihrer Basenzusammensetzung als auch in ihrer Größe voneinander unterscheiden. Man kann - recht schematisch - 3 große Gruppen von Nucleinsäurekomponenten nennen:

sogenannte "messenger-RNA",
ribosomale RNA,
transfer-RNA.

Alle 3 Arten von Ribonucleinsäuren werden nach der Matrize der Zellkern-DNA gebildet. Neben diesen RNA-Spezies, die nach dem Vorbild der Zellkern-DNA synthetisiert werden, kennen wir heute auch Ribonucleinsäuren, die von entsprechenden Polymerasen nach der Matrize der mitochondrialen DNA gebildet werden.

Während über die Synthese von transfer-RNA bis heute noch sehr wenig bekannt ist, werden sowohl die ribosomale RNA als auch die messenger-RNA im Warmblütergewebe offenbar zunächst in sehr großmolekularer Form synthetisiert. Diese großmolekulare RNA ist außerordentlich labil und nur unter Einhaltung ganz bestimmter experimenteller Kriterien zu isolieren. Sie zerfällt - anscheinend unter der Wirkung bestimmter RNasen - in kleinere Bruchstücke, die eigentliche messenger-RNA bzw. ribosomale RNA.

Messenger-RNA ist beim Warmblüter - vielleicht mit Ausnahme von Reticulocyten - bisher nicht sicher nachgewiesen worden. Bereits der Begriff von "messenger-RNA" ist vergleichsweise schwer zu definieren. Man versteht hierunter im allgemeinen schnell markierbare RNA, die als Matrize zur Bildung spezifischer Proteine dienen

kann. Der Nachweis von messenger-RNA ist daher erst dann überzeugend erfolgt, wenn die Synthese eines spezifischen Proteins unter der Mitwirkung solcher RNA demonstriert wurde. Dies ist im Falle von Warmblütergewebe bisher in noch keinem Falle möglich gewesen. Es besteht jedoch kein Zweifel darüber, daß nicht alle schnell markierbare RNA "messenger-RNA" ist. Im Gegenteil wird z.B. die ribosomale, hochmolekulare Vorstufe außerordentlich schnell nach einem Angebot radioaktiv markierter Vorstufen markiert. Versuche bei Bakterien sprechen dafür - und es ist wohl auch nicht anders zu erwarten - daß es sich bei den "messenger-RNA" um eine Vielzahl verschiedener RNA-Moleküle handelt, die auch in ihrer Molekül-Größe durchaus nicht einheitlich sind. Dies ist deshalb verständlich, da in einer Zelle eine Vielzahl verschiedener Proteine mit ganz verschiedenem Molekulargewicht gebildet werden müssen. Bei unserem heutigen Stand der Kenntnisse ist daher "messenger-RNA" ein ungeeignetes Objekt zur Messung von Markierungsraten. Es ist nicht damit zu rechnen, daß bei wiederholten Versuchen eine konstante Markierungsrate erreicht wird.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den hochmolekularen ribosomalen Vorstufen. Auch diese sind relativ labil und es muß damit gerechnet werden, daß bei der Aufarbeitung eine variable Menge dieser Substanz gespalten wird und verlorengeht.

Auch die transfer-RNA-Fraktion ist außerordentlich heterogen. Es sind bis heute mindestens 30 verschiedene transfer-RNA nachgewiesen worden und es liegen Hinweise dafür vor, daß sich beispielsweise in Mitochondrien noch weitere - von der hyaloplasmatischen Fraktion verschiedene - transfer-RNA-Moleküle befinden. Für eine exakte Bestimmung der Markierungsrate ist daher auch die transfer-RNA-Fraktion zunächst ebenfalls relativ ungeeignet.

Klar definierbar ist hingegen die ribosomale RNA. Diese RNA besteht aus 2 Untereinheiten, nämlich - in Warmblütergeweben - der 28-S-Komponente und der 18-S-Komponente. Beide Untereinheiten lassen sich vergleichsweise leicht, z.B. im Saccharosegradienten, von den übrigen RNA-Spezies abtrennen und rein darstellen. Im Vergleich zu den anderen RNA-Komponenten ist es daher durchaus möglich, die Veränderung der spezifischen Aktivität in der 28-S- und der 18-S-RNA zu verfolgen.

Obgleich es möglich ist- wie unsere Versuche gezeigt haben - mit allen benutzten Vorstufen die verschiedensten RNA-Komponenten zu markieren, wurden die in den folgenden Abschnitten geschilderten Experimente aus den geschilderten Gründen zunächst bewußt nur mit der ribosomalen RNA durchgeführt. Es war das Ziel, die

Methoden mit dieser klar definierbaren RNA zu standardisieren, um dann später auf andere RNA-Komponenten übergehen zu können. In großer Zahl durchgeführte Fraktionierungsexperimente haben ergeben, daß eine Markierung großmolekularer RNA unter unseren Versuchsbedingungen durchaus erfolgt und daß eine Abtrennung solcher großmolekularer RNA auch möglich ist. Auf eine Diskussion der Markierung der großmolekularen RNA-Komponenten wird im Rahmen dieser Arbeit jedoch bewußt verzichtet, ebenso wie auf eine Diskussion der Markierung von transfer-RNA.

Eine Markierung der nach der Phenol-Methode isolierten und im Saccharose-Gradienten gereinigten ribosomalen RNA-Komponenten konnte im embryonalen Gewebe mit allen benutzten Vorstufen erreicht werden. Im Lebergewebe war die Markierung unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht messbar bei Anwendung von Uracil, Asparaginsäure oder Glycin. Einige charakteristische Kurven, die nach der Gradientenfraktionierung erhalten wurden, sind in den Abbildungen 4 u. 10 wiedergegeben. Die genaue Analyse zeigt selbst im Falle der Orotsäure, die - wie bereits ausgeführt - kaum auf den Embryo übergeht, einen Markierungsverlauf, der dem der ribosomalen Komponente - gemessen als Verlauf der Extinktion bei 260 nm - vollkommen entspricht. Der Unterschied kommt im Vergleich zum Lebergewebe gut zum Ausdruck. In der Abbildung 9 muß der vollkommen verschiedene Maßstab beachtet werden. Die spezifische Aktivität der ribosomalen RNA ist im Lebergewebe mehr als 150 mal höher als im embryonalen Gewebe.

Interessant ist natürlich ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten, wie sie unter gleichen Versuchsbedingungen - es wurden die gleichen Versuchstiere benutzt - einmal mit Hilfe der Säure-Laugen-Fraktionierung und zum anderen nach der Isolierung definierter RNA-Komponenten gemessen werden können. Natürlich ist ein Vergleich nur bedingt möglich, weil im Falle der Säure-Laugen-Fraktionierung die spezifische Aktivität in der Summe aller RNA-Komponenten gemessen wird, der nach Phenol-Extraktion und Gradienten-Zentrifugation die isolierte ribosomale RNA gegenübergestellt wird. Aus der Tabelle S. 41 kann man erkennen, daß im Falle des embryonalen Gewebes eine erstaunlich gute Übereinstimmung erzielt wird. Im Falle des Lebergewebes ist die Übereinstimmung nicht ganz so überzeugend. Sie ist noch zufriedenstellend, wenn eine Vorstufe benutzt wird, die überwiegend in Nucleinsäuren eingebaut wird, wie z.B. Orotsäure oder Uridin. Bei den Vorstufen, die gleichzeitig zu einer erheblichen Markierung von Proteinen und Lipiden führen, wie z.B. Asparaginsäure, Glycin, Glucose und Uracil, ergibt die Methode der Säure-Laugen-Fraktionierung zu hohe Werte. Es ist uns aus früheren Untersuchungen bekannt, daß die Bestimmung der Nucleinsäurefraktionen nach

dieser Methode immer dann unzuverlässige Werte ergibt, wenn andere Zellkomponenten in hohem Maße ebenfalls markiert werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß beispielsweise bei der Hitze-Extraktion der DNA eine gewisse Menge von Proteinen mit hydrolisiert wird. Diese Aktivität aus den Proteinen findet sich dann in der DNA-Fraktion. Es war für uns vor allem interessant zu sehen, daß im Falle des embryonalen Gewebes solche Fehlerquellen offenbar eine geringe Bedeutung besitzen.

g) Versuche über den Einbau von C^{14}-Glucose in ribosomale RNA in vivo.

Da die Vorversuche gezeigt hatten, daß bei Benutzung von C^{14} -markierter Glucose oder von P^{32} als Vorstufen besonders günstige Bedingungen vorliegen und zudem diese Substanzen wegen ihres vergleichsweise niedrigen Preises gut zu Routineuntersuchungen geeignet sind, haben wir besonders ausgedehnte Versuchsreihen mit C^{14}-Glucose durchgeführt. Routinemäßig wurde 1 mCi/kg uniform C^{14}-markierte Glucose intravenös injiziert.

α) Zeitliche Abhängigkeit des Einbaues nach der Injektion.

1 Stunde nach der intravenösen Injektion läßt sich eine Markierung in der 28-S-Komponente von Embryonen nachweisen. Kurze Zeit später (nach 1,5 Stunden) ist auch die 18-S-Komponente radioaktiv markiert. In den Abbildungen sind die größer- und die kleinermolekularen RNA-Komponenten absichtlich abgeschnitten worden. Im Verlaufe der nächsten Stunden steigt die Radioaktivität in den beiden ribosomalen Komponenten weiter an. Sie hat auch nach 5 Stunden noch kein Maximum erreicht, wie die Ergebnisse einiger orientierender Versuche zeigen, die über 10 Stunden ausgedehnt wurden. Die zeitliche Abhängigkeit des Anstieges der spezifischen Aktivität in den beiden ribosomalen Komponenten ist in der Abbildung/6 zusammengefaßt worden.

Wie bereits aus den Aktivitätsmessungen im Serum geschlossen wurde, zeigen auch diese Versuchsserien, daß nach der Gabe radioaktiv markierter Glucose ganz offenbar keine Pulsmarkierung erreicht wird, sondern daß eine Markierung der verschiedenen RNA-Komponenten auch nach einmaliger Injektion über einen außerordentlich langen Zeitraum erfolgt. Die Tatsache, daß auch nach 5 bis 10 Stunden noch eine erhebliche spezifische Aktivität in den großmolekularen

Zeitliche Abhängigkeit der spez. Aktivität der 28 S-RNA

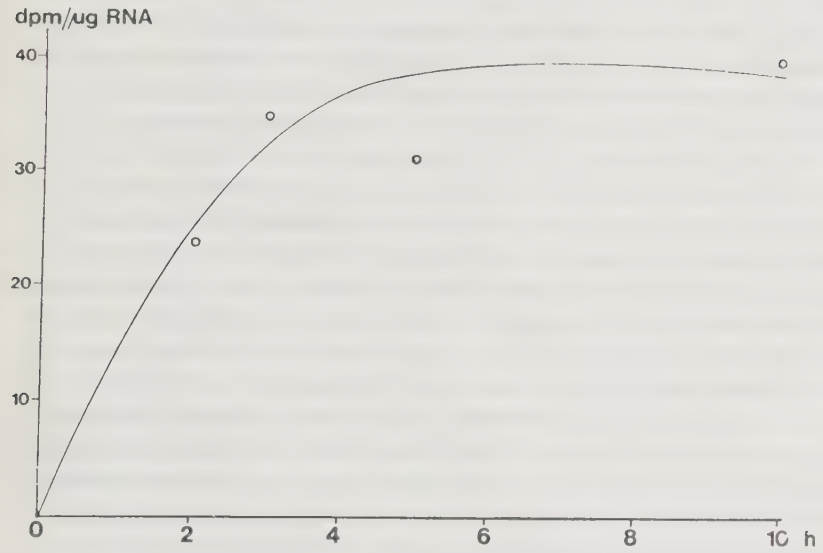


Abbildung 16

Schwangere Tiere erhielten am Tag 13 der Schwangerschaft 1 mCi/kg Glucose intravenös injiziert. Die RNA wurde nach der Phenolmethode verschiedene Zeiten nach der Injektion aus den Embryonen isoliert und im Saccharosegradienten aufgeschlüsselt. In Abhängigkeit von der Versuchszeit kann ein Anstieg der spezifischen Aktivität in der 28 S-Komponente bis zu 3 Stunden nachgewiesen werden. Danach stellt sich ein "steady state" ein. Ein regelrechter Abfall der spezifischen Aktivität in der RNA kann in dem untersuchten Zeitraum nicht nachgewiesen werden.

Komponenten gefunden wird (größer als 32 s), unterstützt diese Ansicht. Der auch noch nach Stunden nachweisbare Anstieg der spezifischen Aktivität beruht daher sicher nicht nur auf einer Umwandlung großmolekularer Komponenten in ribosomale RNA, einem Vorgang, der bestimmt auch eine gewisse Zeitspanne erfordert.

Der Anstieg der spezifischen Aktivität in der Ribonucleinsäure ist - wie bereits diskutiert - u.a. eine Funktion der Durchblutung, der Permeabilität von Placentarschranke und Zellmembran sowie anderer Faktoren. Es ist darum sehr viel günstiger, kinetische Messungen über den Umsatz bestimmter RNA-Komponenten aus der zeitlichen Abhängigkeit des Abfalles der spezifischen Aktivität zu berechnen. Ein solches Vorgehen ist nach einer Markierung mit C^{14}-markierter Glucose erst nach einem Zeitraum von über 10 Stunden möglich. Es ergibt sich daher die Frage, ob solche Messungen des Umsatzes - nicht der Markierungsrate - nicht besser mit Vorstufen durchgeführt werden, die eher zu einer Pulsmarkierung führen. Bei der Untersuchung embryonalen Gewebes kommt noch erschwerend hinzu, daß die Wachstumsrate so hoch ist, daß es während einer Versuchsperiode von mehr als 12 Stunden zu einem erheblichen Zuwachs an RNA kommt. Der Abfall der spezifischen Aktivität resultiert daher sowohl aus dem Umsatz der betreffenden Komponenten als auch aus der "Verdünnung" der Radioaktivität durch die neugebildete, nichtmarkierte RNA. Da der Faktor der Neubildung im Falle des embryonalen Gewebes eine erhebliche Korrektur notwendig macht, kann der Umsatz nur verhältnismäßig ungenau berechnet werden. Wir haben daher im Rahmen dieser Arbeit auf eine Berechnung des Umsatzes der ribosomalen RNA-Komponenten in embryonalem Gewebe verzichtet.

β) Einbau von C^{14}-Glucose in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung

Natürlich interessierte uns besonders, ob ein Unterschied im Nucleinsäurestoffwechsel in den verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden kann. Es wurde daher eine größere Zahl von Versuchsserien angesetzt, bei denen die radioaktive Markierung der ribosomalen RNA-Komponenten vom Tag 11 bis Tag 14 der Schwangerschaft untersucht wurde. Der Nucleinsäurestoffwechsel muß in den früheren Stadien der embryonalen Entwicklung - z.B. am Tag 11 der Schwangerschaft - besonders hoch sein. Messungen des RNA-Gehaltes im Embryo haben ergeben, daß der RNA-Gehalt in dieser Periode eine Versechs- bis Versiebenfachung innerhalb von 24 Stunden erfährt. Untersuchungen der RNA-Polymerase-Aktivität

haben weiterhin gezeigt, daß besonders die RNA-Polymerase eine sehr hohe Aktivität aufweist, die zur Bildung von ribosomaler RNA führt (NEUBERT et al., 71a).

Aus der Abbildung geht hervor, daß am Tag 11 tatsächlich ein außerordentlich hoher Einbau von C^{14}-Glucose in beide Komponenten der ribosomalen RNA erfolgt. Zum Vergleich sind in der Abbildung entsprechende Werte, die mit Embryonen am Tag 13, bzw. mit Lebergewebe, gewonnen wurden, wiedergegeben. Die spezifische Aktivität, die 5 Stunden nach der intravenösen Injektion von C^{14}-Glucose in den beiden ribosomalen RNA-Komponenten in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung gemessen wurde, ist aus der Abbildung 17 zu ersehen.

Wie bereits in früheren Abschnitten der Arbeit ausführlich diskutiert, erlaubt die alleinige Messung der spezifischen Aktivität noch keine Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit der RNA-Synthese. Es muß vielmehr ausgeschlossen werden, daß die Glucose in den früheren Stadien der embryonalen Entwicklung besser in das Gewebe übertritt und daher eine höhere Konzentration des Precursors zur Verfügung steht. Weiterhin haben wir keine Kenntnisse über die "Pool"-Größen der verschiedenen Zwischenstufen in den einzelnen Stadien der Entwicklung. Eine solche Bestimmung erscheint auch fast hoffnungslos, da nicht nur die Zahl der Zwischenstufen außerordentlich groß ist, sondern auch eine Verteilung auf verschiedene Kompartments berücksichtigt werden müßte.

Zusammen mit der recht hohen RNA-Polymerase-Aktivität am Tag 11 sprechen die Befunde jedoch wohl für eine ausgeprägte RNA-Synthese in diesem Stadium der embryonalen Entwicklung. Zur Klärung dieser Frage könnten auch in-vitro-Versuche beitragen. Im Abschnitt K wird daher noch einmal auf diese Frage eingegangen.

γ) Einbau in die verschiedenen Mononucleotide der RNA.

Zur Synthese aller RNA-Komponenten werden die Nucleosid-Triphosphate der 4 in den Nucleinsäuren enthaltenen Komponenten benötigt (s. Abbildung 13). Da die Nucleosid-Triphosphate die direkten Vorstufen der Synthese von Nucleinsäuren darstellen, könnte die Markierung in der RNA einen Anhalt über die spezifische Aktivität der vier Nucleosid-Triphosphate am Ort der RNA-Synthese geben - unter der Voraussetzung, daß eine definierte RNA untersucht wird, und überwiegend neugebildete RNA erfaßt wird. Diese Voraussetzungen treffen für kurzlebige,

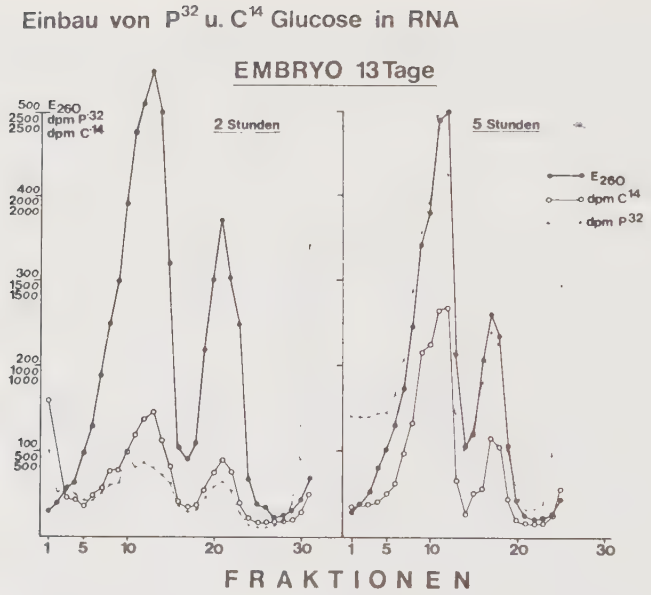


Abbildung 17

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 16 angegeben. Nach 5-stündiger Einwirkung wird sowohl mit P^{32} als auch mit C^{14}-Glucose ein höherer Einbau erzielt, als 2 Stunden nach der Injektion. Eine "Pulsmarkierung" ist daher weder mit Glucose noch mit P^{32} möglich.

großmolekulare Vorstufen weitgehend zu. Bei den ribosomalen Komponenten muß zunächst die Verdünnung durch die bereits vorhandene, nicht markierte RNA berücksichtigt werden. Es ist daher fraglich, ob unter den Versuchsbedingungen bei den ribosomalen Komponenten ein Gleichgewicht, bei dem die neugebildete RNA überwiegt, erreicht werden kann. Die Voraussetzungen liegen jedoch sehr viel günstiger, wenn nur die Relationen der spezifischen Aktivitäten in den Vorstufen beurteilt werden sollen. In diesem Falle genügt ein Vergleich der Markierung der verschiedenen Mononucleotide in der RNA. Eine Bildung von Nucleosid-Triphosphaten kann prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: Entweder durch Phosphorylierung entsprechender Basen, Nucleoside oder Nucleotide, die aus dem Abbau von Nucleinsäuren stammen. Diese Art der Bildung von Nucleosid-Triphosphaten wird als "salvage-pathway" bezeichnet. Er scheint besonders in den Geweben eine besondere Bedeutung zu besitzen, bei denen entweder der Zerfall von Nucleinsäurekomponenten ein großes Ausmaß erreicht oder bei denen die Rate der Neubildung etwa dem Abbau entspricht. Diese beiden Voraussetzungen sind im embryonalen Gewebe ganz sicher nicht erfüllt. Es spricht nichts dafür, daß der Abbau von Nucleinsäuren in diesem Gewebe ein hohes Ausmaß erreicht. Weiterhin kommt es zu einem erheblichen Anstieg des Nettogehaltes an RNA, während sehr kleiner Zeitspannen. Dieser Nucleinsäurezuwachs übersteigt den von allen anderen Warmblütergeweben beträchtlich.

Man kann bereits aus diesen Tatsachen schließen, daß das embryonale Gewebe seinen hohen Bedarf an Nucleinsäuren nur dadurch decken kann, daß die Vorstufen - nämlich die Nucleosid-Triphosphate - laufend völlig neu synthetisiert werden. Diese "de novo-Synthese" erfolgt im Falle der Pyrimidine aus Carbamyl-Phosphat und Asparaginsäure und im Falle der Purine aus Glycin, Glutaminsäure, Formiat und Bicarbonat. In weiteren Versuchsserien wurden daher die beiden ribosomalen Komponenten isoliert, zu Mononucleotiden hydrolisiert, die Mononucleotide durch Hochspannungselektrophorese aufgetrennt und die spezifische Aktivität in den verschiedenen Mononucleotidkomponenten bestimmt. Auf diese Weise konnte ein Anhalt darüber erhalten werden, wie sich die Markierung in der RNA auf die einzelnen Mononucleotidkomponenten verteilt. Die Resultate derartiger Versuchsreihen sind in den Abbildungen 21/22 wiedergegeben. Zum Vergleich sind entsprechende Werte, die mit ribosomaler RNA aus Leber gewonnen wurden, mit angegeben. Man kann erkennen, daß nach Gabe von C^{14}-Glucose alle vier in der Nucleinsäure enthaltenen Mononucleotide radioaktiv markiert sind. Es findet sich eine annähernd gleiche Markierung in Purin- und Pyrimidinderivaten. Aus den zusammengestellten Daten geht ebenfalls die Verteilung

Spezifische Aktivität in Mononucleotiden von RNA Hydrolysaten von Embryo und Leber

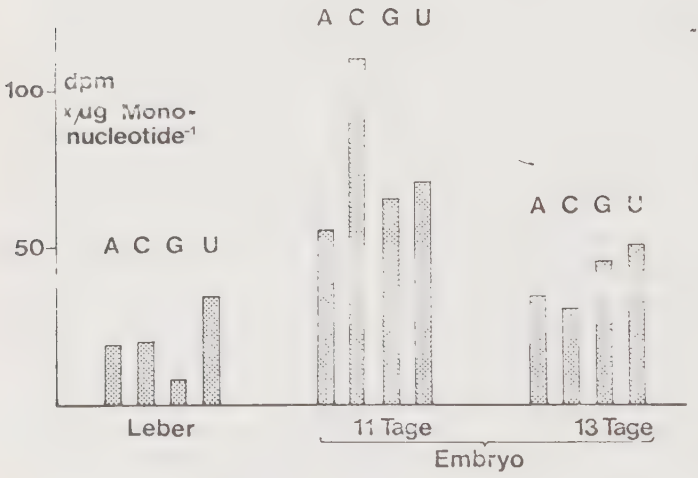


Abbildung 21

Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen Lebergewebe und 11 bzw. 13 Tage alten Embryonen. Die Muttertiere erhielten 1 mCi/kg C^{14}-uniform markierte Glucose einer spezifischen Aktivität von 200 µCi/µMol. 3 Stunden nach der intravenösen Injektion wurden die Embryonen und jeweils ein kleines Stück Leber herauspräpariert. Die RNA wurde nach der Phenolmethode (s. Methoden) extrahiert und über einen Saccharose-gradienten aufgetrennt. 6 Fraktionen aus dem 28 S Peak wurden vereinigt und die RNA alkalisch hydrolisiert. Die Abbildung gibt die spezifische Aktivität in den Mononucleotiden nach Trennung durch Hochspannungs-Elektrophorese an. Die Markierung der einzelnen Nucleotide in der jeweiligen RNA ist relativ gleichmäßig. Die Radioaktivität ist bei 11 Tage-Embryonen in allen 4 Komponenten am höchsten. Aber auch 13 Tage-Embryonen zeigen eine wesentlich höhere spezifische Aktivität in den Mononucleotiden, vergleicht man sie mit den Leberwerten.

Spezifische Aktivität in Mononucleotiden von RNA-Hydrolysaten vom Embryo 13 Tage

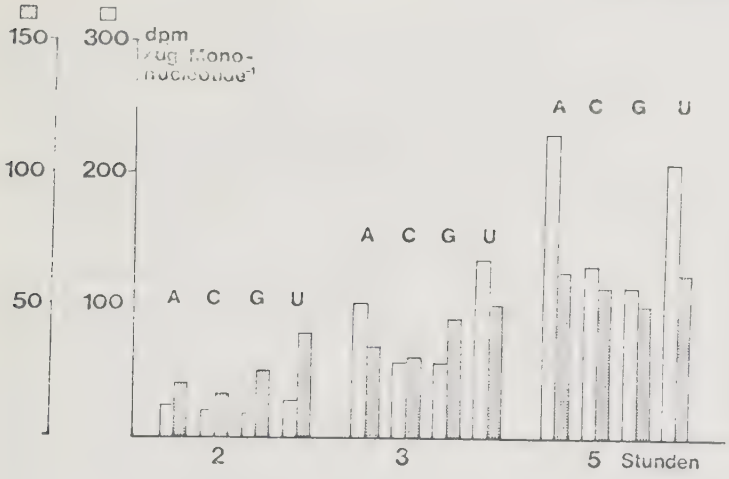


Abbildung 22

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 21 angegeben.

Die schwangeren Tiere erhielten ein Gemisch von 1 mCi C^{14}-Glucose und 3 mCi/kg P^{32} intravenös injiziert. Die weißen Säulen geben die Radioaktivität von P^{32} wieder.

Wie zu erwarten, steigt die radioaktive Markierung in allen Mononucleotiden mit zunehmender Einwirkungszeit an. Auffallend ist jedoch, daß sich in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit sowohl das Verhältnis der radioaktiven Markierung der Basen zueinander als auch die P^{32}-Markierung in den Mononucleotiden ändert.

der Radioaktivität in verschiedenen Stadien der embryonalen Entwicklung (Abbildung 21), sowie der zeitliche Verlauf der Markierung in den verschiedenen Mononucleotiden (Abbildung 22) hervor.

In der Literatur finden sich bisher nur vereinzelte Angaben über die Markierung von Nucleinsäuren nach Gabe von markierter Glucose. ITZHAKI (41) hat Versuche in vitro durchgeführt, bei denen Thymuszellen mit C^{14}-Glucose inkubiert wurden und anschließend die Markierung der Ribose in den vier Mononucleotiden der RNA bestimmt wurde. Bei diesen mit C-6-Glucose durchgeführten in-vitro-Versuchen mit Thymusgewebe fanden ITZHAKI und WHITTLE (42) relative Radioaktivitäten von AMP = 100, GMP = 76 bis 90, CMP = 2 bis 6 und UMP = 23 bis 31. Auch bei Mäuse-Aszites-Tumorzellen betrug der Einbau in die Ribose der Pyrimidinkomponenten nur 40 % des Einbaus in die entsprechenden Purinnucleotide. Für Lebergewebe liegen aus der Arbeit von ITZHAKI und Mitarbeitern nur Angaben für die Purinkomponenten vor, so daß eine vergleichende Beurteilung nicht möglich ist.

Aus den eigenen Versuchen ergibt sich kein Anhalt dafür, daß der Einbau in die CMP-Komponente der Ribonucleinsäuren in Leber oder in embryonalem Gewebe wesentlich langsamer erfolgt als in die anderen Mononucleotid-Komponenten. Es ist zur Zeit nicht zu entscheiden, ob für die Diskrepanz zwischen unseren Befunden und dem von ITZHAKE die verschiedene Versuchsanordnung (in vivo gegen in vitro) oder die Benutzung der verschiedenen Gewebearten verantwortlich gemacht werden muß. Nach unseren Experimenten werden im embryonalen Gewebe alle vier Nucleosid-Triphosphate in annähernd gleichem Maße radioaktiv markiert.

Bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchsserien wurde die Radioaktivität in den Mononucleotiden nach Hydrolyse der RNA bestimmt. In diesen RNA-Fragmenten könnte nach Applikation von C^{14}-markierter Glucose aber sowohl der Riboseanteil als auch der Basenanteil radioaktiv markiert sein. Auch aus diesem Grunde sind unsere angeführten Befunde nur bedingt mit dem von ITZHAKI zu vergleichen.

δ) Einbau von C^{14}-Glucose in die verschiedenen Basen der RNA

In weiteren Versuchsserien wurde daher die Radioaktivität in den vier Basen nach Hydrolyse der RNA bestimmt. Zusammen mit der im vorigen Abschnitt diskutierten Bestimmung der Radioaktivität in den Mononucleotiden ergeben diese Experimente eine vollständige Analyse des Einbaus von Glucosebruchstücken in die verschiedenen Komponenten der ribosomalen RNA. Die Ergebnisse dieser Versuchsserien sind aus der Tabelle 7 zu ersehen. Man kann erkennen, daß im embryonalen Gewebe nach einem Zeitraum von 3 Stunden durchaus ein nennenswerter Einbau aus den Glucosebruchstücken in die einzelnen Basen erfolgt. Ein Vergleich des Einbaus in Purin- und Pyrimidinbasen zeigt, daß die Markierungsrate in den Basen selbst nach 3 Stunden schon verhältnismäßig hoch ist. Aus der Tabelle 7 ist jedoch zu ersehen, daß Uracil immer am höchsten markiert ist. Diese Werte sind mit Sicherheit zu hoch, da eine bei der Aufarbeitung entstandene Verunreinigung nicht quantitativ entfernt werden konnte. Bei den hier zur Trennung angewandten elektrophoretischen Methoden laufen diese Verunreinigungen in Höhe des Uracils mit. Aufgrund der Biogenese der Pyrimidinbasen, die ja sämtlich aus einem Uracil-Nucleotid entstehen, ist zwar zu erwarten, daß Uracil besonders hoch markiert ist, bzw. eine hohe Wechselrate hat. Dennoch erscheinen die Werte, die etwa 4 mal so hoch sind wie die in den entsprechenden anderen Basen, zu hoch. Vergleicht man die Werte von 3 und 10 Stunden miteinander, so ist festzustellen, daß die Markierung in den Basen nach 10 Stunden wesentlich höher ist als nach 3 Stunden. Dies ist zwar auch bei den entsprechenden Mononucleotiden zu demonstrieren, der prozentuale Anteil der Markierung in den Basen ändert sich aber vergleichsweise wenig. Dies ist zunächst überraschend. Man sollte nämlich erwarten, daß der turnover von Ribose und von Basen-Vorstufen nicht unbedingt gleich ist. Die Befunde weisen darauf hin, daß es zu dem Zeitpunkt unserer Untersuchungen bereits weitgehend zu einem Gleichgewichtszustand gekommen ist, und daß sich die spezifische Aktivität in den in Frage kommenden Vorstufen während der Versuchsperiode entweder nur wenig oder aber in den verschiedenen Metaboliten recht gleichsinnig und gleichmäßig ändert. Da aber bisher noch nicht genügend Reihenuntersuchungen vorliegen, so daß wir noch keine genaue Streuung angeben können, sind weitere Untersuchungen zu diesem Problem unbedingt notwendig. Aus den vorliegenden Daten geht jedoch bereits klar hervor, daß unter unseren Versuchsbedingungen nicht nur eine Markierung des Ribose-Anteils der Nucleinsäuren erfolgt, sondern daß auch die Basen bereits zu einem früheren Zeitpunkt radioaktiv markiert werden.

Tabelle

		AMP	CMP	GMP	UMP	A	C	G	U
10 Stunden	18 S	50,5	38	40,8	60	13	10	15	57
	28 S	35	34	29,7	50	15	26	16	61
3 Stunden	28 S	14,2	13,0	13,4	132	7,5	6,1	4,4	27,6
	18 S	--	--	--	--	6,0	6,8	6,9	20,6

Die Tabelle gibt die spezifische Aktivität links in den Mononucleotiden, rechts in den Basen an, nach einer intravenösen Injektion von 1 mCi/kg C^{14}-Glucose. Die Werte für Uracil könnten zu hoch liegen.

Als Vorstufen zur Markierung des Purinskelettes dienen folgende Metaboliten (Abbildung 8):

1.) Glycin,
2.) Formiat,
3.) CO_2 .

Zur Markierung des Pyrimidinskelettes führen die Metaboliten:

1.) Carbamylphosphat,
2.) Asparaginsäure,
3.) Formiat.

Glucose ist insofern eine interessante Vorstufe, weil aus ihr alle 5 Metaboliten, die in die Nucleinsäurebasen eingebaut werden, entstehen können. Es ist daher theoretisch möglich, daß alle C-Atome des Puringerüstes und wahrscheinlich auch mehrere C-Atome des Pyrimidinringes nach einer Gabe von C^{14}-Glucose markiert werden. Wir können allerdings zur Zeit noch nicht eindeutig entscheiden, welche C-Atome der Nucleinsäurebasen unter unseren Versuchsbedingungen vorwiegend markiert werden.
Gewisse Rückschlüsse werden aus Versuchen möglich, die unter ähnlichen Versuchsbedingungen mit C^{14}-Formiat bzw. C^{14}-Bicarbonat durchgeführt wurden. Da durch Applikation von C^{14}-Bicarbonat praktisch keine Markierung der RNA erreicht wird, ist es unwahrscheinlich, daß CO_2 nach Gabe von C^{14}-Glucose als bevorzugter Metabolit in die Nucleinsäurebasen eingebaut wird. Andererseits kann mit C^{14}-Formiat - das nur in Basen eingebaut werden kann - eine recht gute Markierungsrate der embryonalen RNA erreicht werden. Ein Einbau von Glucosebruchstücken in RNA-Basen könnte daher durchaus über Formiat als Zwischenprodukt erfolgen.
Es erscheint wünschenswert, weitere Experimente über die Relationen der Markierung verschiedener C-Atome in den Nucleinsäurebasen durchzuführen, um dadurch einen weiteren Einblick in die Stoffwechselvorgänge des embryonalen Gewebes zu erhalten.

h) Versuche über den Einbau von P^{32} in ribosomale RNA in vivo.

Anorganisches Phosphat kann nach Überführung in eine "energiereiche" Form, z.B. durch die Reaktionen der oxydativen Phosphorylierung oder durch eine energiekonservierende Reaktion der Glycolyse als terminales (γ) Phosphor-Atom in ATP eingebaut werden. Auch eine Markierung des terminalen Phosphor-Atoms von GTP ist - durch Reaktionen der Substratphosphorylierung - möglich (s. Abbildung 23). Mit Hilfe von Transphosphorylasen, z.B. der Myokinase-Reaktion, kann eine Radioaktivität im γ-P-Atom auch auf das β-P-Atom von Nucleosid-Tri- oder Diphosphaten übergehen (s. Abbildung 24). Dagegen ist eine Markierung des α-P-Atoms nur auf Umwegen möglich. Bei einer Synthese von Ribonucleinsäuren werden die beiden letzten Phosphoratome (β und γ) in Form von Pyrophosphat abgespalten und im RNA-Molekül bleibt nur das letzte unmittelbar an der Ribose hängende Phosphor-Atom (α) erhalten. In Nucleinsäuremoleküle eingebaute Phosphor-Atome müssen also in den entsprechenden Nucleosidtriphosphaten in Form des α-P-Atoms vorgelegen haben. Da die wesentlichen energieliefernden Reaktionen der Zelle zu einer Markierung des terminalen (γ) P-Atoms im ATP bzw. GTP führen, ergibt sich die Frage, auf welchem Wege angebotenes anorganisches P^{32} aus der γ-Position in das - für unsere Untersuchungen allein interessante - α-P-Atom der Nucleosid-Triphosphate gelangen kann.

Die Markierung, die ursprünglich in dem terminalen Phosphor-Atom des ATP oder vielleicht auch des GTP vorgelegen hat, kann auf 2 Wegen in die α-Position der Nucleosid-Triphosphate und damit in die Nucleinsäuren gelangen:

1.) Über die Bildung von 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat, das bei einer de-novo-Synthese im Falle des Purinstoffwechsels bereits mit einer sehr frühen Vorstufe reagiert, oder im Falle der Pyrimidine einen Ribose-5-Phosphatrest an die Orotsäure ankoppelt (s. Abbildung 20), oder

2.) durch Reaktion
   a) von Phosphoribosyl-Pyrophosphat mit Basen,
   b) oder auch direkt von ATP mit Nucleosiden, die als Abbauprodukte entstanden sind (s. Abbildung/9).

Im ersten Fall und im Fall 2 a könnte eine Markierung der Nucleinsäuren mit Phosphat weitgehend parallel mit einer Markierung der Ribose erfolgen, wie sie nach Gabe C^{14}-markierter Glucose erreicht werden kann (s. Abbildung 20). Da das P^{32} offenbar etwas schneller eliminiert wird, als die C^{14}-Glucose, steht zu erwarten,

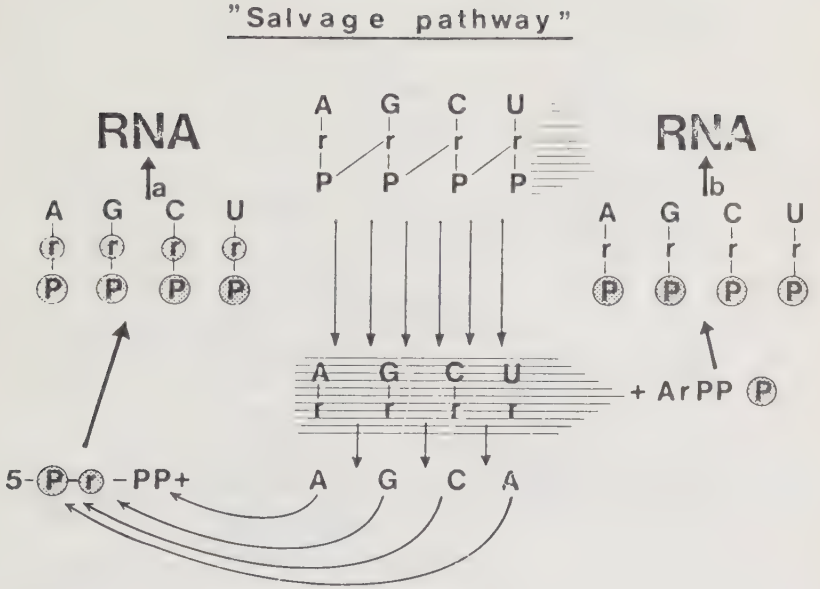


Abbildung 19

RNA-Bruchstücke können entweder bis zur Stufe der Nucleoside oder bis zur Stufe der Basen niedergebrochen werden. Basen werden dann mit Hilfe von Phospho-Ribosyl-Pyrophosphat wieder zu Nucleotiden aufgebaut und (a) in die RNA eingebaut. Ausgehend von den Nucleosiden können mit Hilfe von ATP wiederum Nucleotide aufgebaut werden. Auch diese können (b) in die RNA eingebaut werden. Eine Markierung ist in diesem Falle unabhängig von einer Markierung des Riboseanteils möglich.

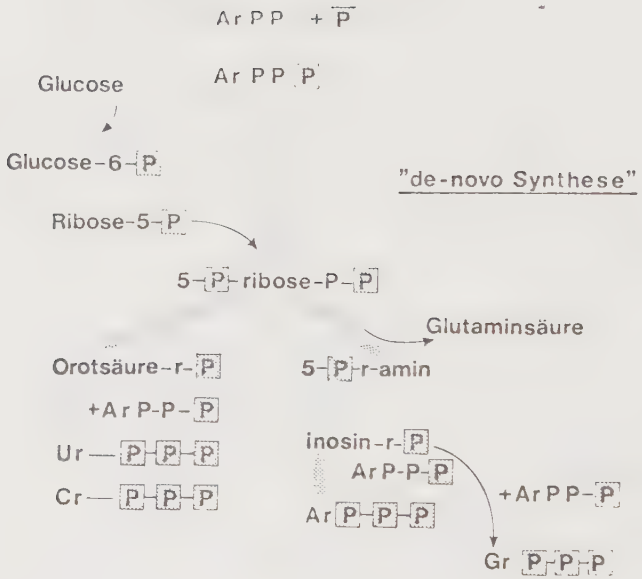


Abbildung 20

Wege, auf denen eine Markierung des α-P-Atoms in den verschiedenen Nucleosid-Triphosphaten erreicht werden kann. Es sind in dieser Abbildung nur die Bedingungen einer "de novo Synthese" berücksichtigt. Die gepunkteten Felder geben P^{32} wieder.

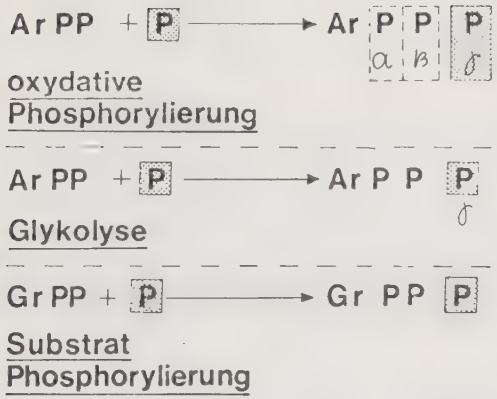


Abbildung 23

Möglichkeiten, durch die im Stoffwechsel von Säugetierzellen eine Markierung des γ-P-Atoms in Nucleosid-Triphosphaten erreicht werden kann.

Abbildung 24

Beispiel einer Reaktion, die zur Markierung eines β-P-Atoms im ATP, ausgehend von einem im γ-P-Atom markierten ATP-Molekül führen kann.

daß die spezifische Aktivität im terminalen Phosphoratom des ATP schneller absinkt als das bei der Ribose der Fall ist. Das Verhältnis C^{14}/P^{32} könnte sich daher im Laufe der Zeit im Ribose-5-Phosphat verändern. Eine solche Veränderung in der spezifischen Aktivität des Ribose-5-Phosphates würde allerdings die de-novo-Synthese aller Nucleosid-Triphosphate in gleicher Weise beeinflußen.

Ein wesentlicher Unterschied der Markierungsrate der Nucleinsäuren mit diesen beiden Isotopen ist jedoch dann zu erwarten, wenn ein erheblicher Teil der Nucleosid-Triphosphat-Vorstufen durch Phosphorylierung von Nucleosiden (s. Abbildung 19) entsteht. In diesem Falle sollte die Markierung mit P^{32} wesentlich über der liegen, die man nach Gabe von C^{14}-markierten Vorstufen erreicht, da Ribose nicht erneut eingebaut wird.

ITZHAKI (41) fand in den von ihm durchgeführten in-vitro-Versuchen tatsächlich einen erheblichen Unterschied, wenn er parallel die Nucleinsäuren entweder mit C^{14}-Glucose oder mit P^{32} markierte. Im Gegensatz zu der Markierung mit C^{14} waren in seinen Versuchen nach Gabe von P^{32} alle Mononucleotide etwa gleich stark markiert. Dieser Befund könnte so gedeutet werden, daß unter den Bedingungen von ITZHAKI die Pyrimidin-Nucleotid-Vorstufen bevorzugt auf dem "salvage pathway", und zwar über Nucleoside gebildet wurden.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse einiger eigener Versuche, die mit P^{32} durchgeführt wurden. 3 Stunden nach Gabe von P^{32} sind die beiden ribosomalen Komponenten sowohl in Leber als auch in embryonalem Gewebe gut markiert. Auch bei diesen Versuchen fällt wieder auf, daß die Markierung bei 11 Tage alten Embryonen wesentlich höher ausfällt, als bei 13 Tage alten Embryonen oder bei Leber.

i) Doppelmarkierungsversuche mit C^{14}-Glucose und P^{32} in vivo.

Da die Isolierung der Nucleinsäure-Fraktionen und die Bestimmung der spezifischen Aktivität in den Mononucleotid- oder Basenanteilen relativ aufwendig ist, haben wir versucht, durch Doppelmarkierungsversuche aus einem Experiment möglichst viel Informationen zu bekommen. Bei diesen Doppelmarkierungsversuchen wurde so vorgegangen, daß die Versuchstiere eine Mischung von C^{14}-Glucose und P^{32} intravenös injiziert bekamen. Die Einbauraten konnten dann unter völlig identischen Bedingungen gemessen und miteinander verglichen werden. Das Vorgehen wurde durch Benutzung eines Packard-Liquid-Szintillations-Zählsystems mit dpm-Automatik, das

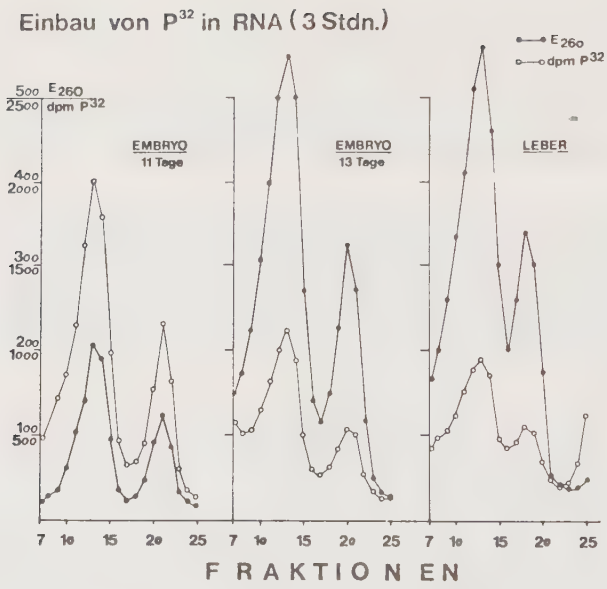


Abbildung 25

Schwangere Tiere erhielten 3 mCi/kg P^{32} intravenös injiziert. Embryonen und kleine Leberstücken wurden 3 Stunden nach der Injektion herauspräpariert, die RNA nach der Phenol-Methode isoliert und im Saccharosegradienten aufgeschlüsselt. Auf der Ordinate geben die oberen Zahlen die Extinktion, die unteren Zahlen die Radioaktivität wieder. Verglichen mit dem Einbau in Lebergewebe und mit 13 Tage alten Embryonen ist der Einbau bei 11 Tage alten Embryonen außerordentlich hoch. Der Verlauf der Radioaktivität folgt in allen Fällen der Extinktionskurve.

Tabelle

Verhältnis des Einbaus von C^{14} und P^{32} in die verschiedenen Mononucleotide von 28 S RNA

Stunden Einwirkung		2	3	5
A	P^{32}	100 %	421 %	997 %
	C^{14}	100 %	170 %	315 %
C	P^{32}	100 %	280 %	655 %
	C^{14}	100 %	188 %	356 %
G	P^{32}	100 %	329 %	676 %
	C^{14}	100 %	180 %	200 %
P^{32} A/G		1,41	1,80	2,02
C^{14} A/G		0,80	0,76	1,26
P^{32} A/C^{14} A		1,2	2,97	3,68
P^{32} G/C^{14} G		0,68	1,24	2,3

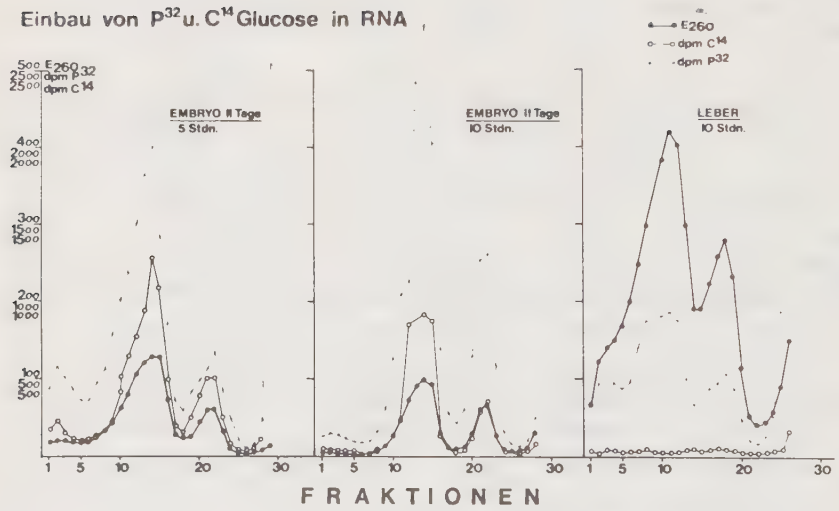


Abbildung 26

Doppelmarkierungsversuch mit P^{32} und C^{14}-Glucose. Die Tiere erhielten eine Mischung von 3 mCi P^{32} und 1 mCi C^{14}-Glucose/kg intravenös injiziert. Die RNA wurde aus den Embryonen bzw. aus Leberstücken nach der Phenolmethode isoliert und im Saccharosegradienten aufgeschlüsselt. Während Glucose 3 bis 5 Stunden nach der Injektion zu einer geringgradigen Markierung ribosomaler RNA in der Leber führt, ist 10 Stunden nach der Injektion kaum noch eine Markierung in der RNA der Leber nachzuweisen. Die Versuche zeigen, daß im Falle der Embryonen mit einer Doppelmarkierung Einbauraten erreicht werden, die etwa denen entsprechen, die nach Anwendung der einzelnen Isotope allein erreicht werden. Die Technik der Doppelmarkierung ist daher für Routineuntersuchungen besonders gut geeignet.

für die direkte Zählung von P^{32} programmiert wurde, wesentlich vereinfacht. Die C^{14}-Aktivität konnte dann durch einfache Substraktionsrechnung erhalten werden. Die Abbildungen 17, 26 geben einige Profile von Saccharose-Gradienten-Zentrifugationen wieder, aus denen man erkennen kann, daß sich die beiden radioaktiven Substanzen nicht gegenseitig beeinflußen. Die einzelnen Kurven entsprechen weitgehend denen, die nach Gabe nur einer radioaktiven Substanz erhalten wurden. Wir haben daher im folgenden diese Versuchsanordnung der Doppelmarkierung routinemäßig angewandt.

Abbildung 22 gibt die Ergebnisse einer Versuchsserie wieder, bei der die Radioaktivität in den einzelnen Mononucleotiden in der ribosomalen RNA 13 Tage alter Embryonen aufgeschlüsselt wurde. Es ist interessant, daß die spezifische Aktivität in den Mononucleotiden auch nach Gabe von P^{32} noch bis zu einem Zeitpunkt von 5 Stunden nach der Injektion ansteigt. Die Kinetik des Einbaus von P^{32} unterscheidet sich jedoch deutlich von der des Einbaus der C^{14}-Aktivität. Es dürfte wichtig sein, den Einbau von P^{32} im Vergleich zu dem Einbau von C^{14} in Ribose bzw. in die Basen aufzuschlüsseln.

k) Versuche über den Einbau von verschiedenen Precursoren in vitro unter besonderer Berücksichtigung von P^{32} und C^{14}-Glucose.

Die bisher geschilderten in-vivo-Versuche weisen teilweise den Nachteil auf, daß die Aufnahme der radioaktiven Vorstufe durch die Placentarschranke limitiert wird. Es war daher von Interesse, über ein in-vitro-System zu verfügen, das es erlaubt, Einbaustudien an - wenn möglich weitgehend intakten - Embryonen durchzuführen. Mit einem solchen in-vitro-System sollte - zusätzlich zu der beschriebenen in-vivo Versuchsanordnung - folgendes möglich sein:

1.) Stoffwechselmessungen mit Vorstufen, die wegen der schlechten Permeation in-vivo nicht angewandt werden können (z.B. Orotsäure) und
2.) Pharmakologische Untersuchungen unter Ausschaltung der Placentarbarriere mit definierten Konzentrationen von Pharmaka unter Bedingungen, bei denen Faktoren wie Resorption, Elimination und Penetration von untergeordneter Bedeutung sind.

α) Einbau von Orotsäure

Die in-vivo-Versuche hatten ergeben, daß Orotsäure zwar auf den Embryo übergeht, die Menge aber für praktische Untersuchungen nicht ausreicht. Im Lebergewebe konnte dieser Stoff - wie bekannt - in relativ hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Abbildungen 9 und 27 zeigen, daß dieser Precursor die Placentarschranke offensichtlich nur schlecht überwindet. Nach 15-minütiger Inkubation der Embryonen in-vitro in einer etwas modifizierten Krebs-Ringer-Lösung (s. unter Methoden, S. 5) wurde Orotsäure nämlich von 13 Tage alten Embryonen recht gut aufgenommen. Mit 20 dpm/µg DNA in der Summe der säureunlöslichen Fraktionen zeigt das embryonale Gewebe eine relativ hohe Aktivität. In-vivo wurden nach Gabe von 1 mCi/kg nur maximal 4,2 dpm/µg DNA gefunden. Die Abbildung zeigt, daß nach der in-vitro-Inkubation 80 % der säureunlöslichen Aktivität in den Nucleinsäuren zu finden sind. Der recht hohe Anteil von etwa 20 % in der Lipidfraktion scheint - wie bei den in-vivo-Versuchen - auf unveränderte Orotsäure zurückzuführen zu sein, die in den vorangegangenen Waschungen mit verdünnter PCS ausgefallen ist und nun in der Lipidfraktion im Äther-Alkohol-Gemisch aus dem Sediment herausgelöst wurde. Ein echter Einbau in Lipide erscheint unwahrscheinlich. Aus dem Diagramm von Saccharose-Gradienten (Abbildung 27) erkennt man, daß die unter diesen Bedingungen gewonnene RNA nur in den hochmolekularen Komponenten markiert ist.

β) Einbau von Formiat

Formiat erwies sich schon in-vivo als ein sehr guter Precursor. Aus der Abbildung 28 ist zu ersehen, daß diese Vorstufe auch in-vitro auf den Embryo übergeht. Die Gesamtimpulsrate in den säureunlöslichen Fraktionen ist mit 63 dpm/µg DNA nicht niedrig. Die Verteilung der Aktivität auf die einzelnen Fraktionen RNA, DNA, Lipid und Protein gleicht dem Verteilungsmuster in-vivo. Eine Fraktionierung der RNA zeigt, daß auch bei Anwendung von Formiat - genau wie bei der Orotsäure - nach 15-minütiger Inkubation in-vitro die Markierung zum überwiegenden Teil in der hochmolekularen RNA-Fraktion gefunden wird.

γ) Morphologie der Embryonen nach Inkubation in Serum und elektrolyt-haltigem Medium.

Schon die in-vivo-Versuche hatten ergeben, daß radioaktiv markiertes Orthophosphat auf den Embryo sehr gut übergeht und in relativ hohen Konzentrationen - besonders

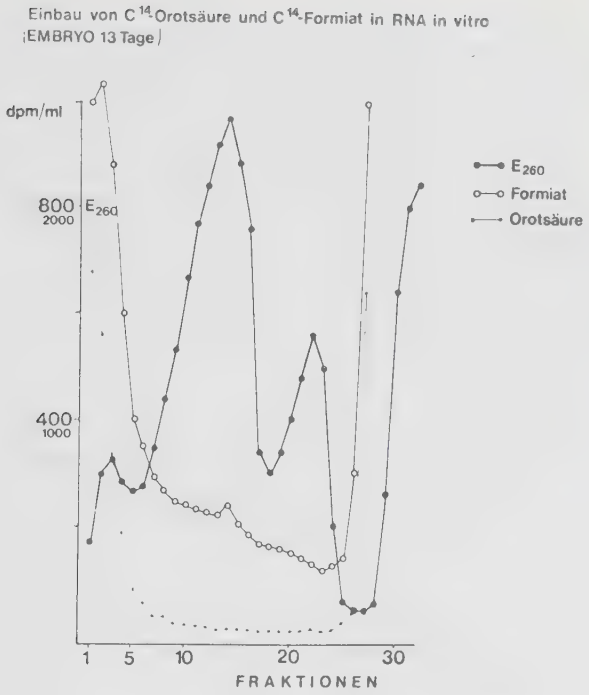


Abbildung 27

13 Tage alte, intakte Rattenembryonen wurden in vitro in einer Ringer-Lösung ohne Zusatz von Serum 15 Minuten lang inkubiert. Die Versuchsansätze enthielten 10 µCi/ml C^{14}-Orotsäure oder C^{14}-Formiat. Die Embryonen wurden anschließend in Mg^{++}-haltiger Saccharose-Lösung homogenisiert, die RNA nach der Phenol-Methode isoliert und im Saccharosegradienten aufgeschlüsselt.

Bei Anwendung beider Vorstufen ist es zu einer sehr guten Markierung hochmolekularer RNA-Komponenten gekommen. Die große Schrift auf der Ordinate bezeichnet die Extinktion, die kleine Schrift die dpm/ml.

Die Abbildungen 39-43 stellen elktronenoptische Aufnahmen von 13 Tage alten Embryonen dar, die 3 Stunden in einer Krebs-Ringer-Lösung (und) bzw. in einer Serum enthaltenden Krebs-Ringer-Lösung unter Zusatz von 0,1 % Glucose bei 37° C inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Embryonen in Karnovski-Puffer (= 3% Paraformaldehyd 3% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2) fixiert. Nach Fixierung in 1% OsO_4 in Phosphatpuffer pH 7,2 wurde in aufsteigender Acetonreihe (50 : 100%) entwässert. Die Einbettung erfolgte in Mikropal (Kunstharz). Die Schnitte wurden mit einem LKB-Ultroton (ungefähr 500 - 700 A) ausgeführt. Zur Kontrastierung wurde Uranylacetat-Bleiacetat benutzt. Die Bilder wurden mit einem Siemens-Elmiskop 1 bei einer Primärvergrößerung von 2000 bis 40 000 aufgenommen.

Abbildung 39
Vergrößerung 1 : 7000. Die Abbildung zeigt eine Übersicht von der oberflächlichen Schicht mit Epithel(E), Mesenchymzellen (M), endoplasmatischem Reticulum (eR) und Cytolysomen (L). Man sieht erweiterte Interzellularräume und Hohlräume des eR. Leichte Mitochondrienschwellung. Die Zellen sind geschädigt.

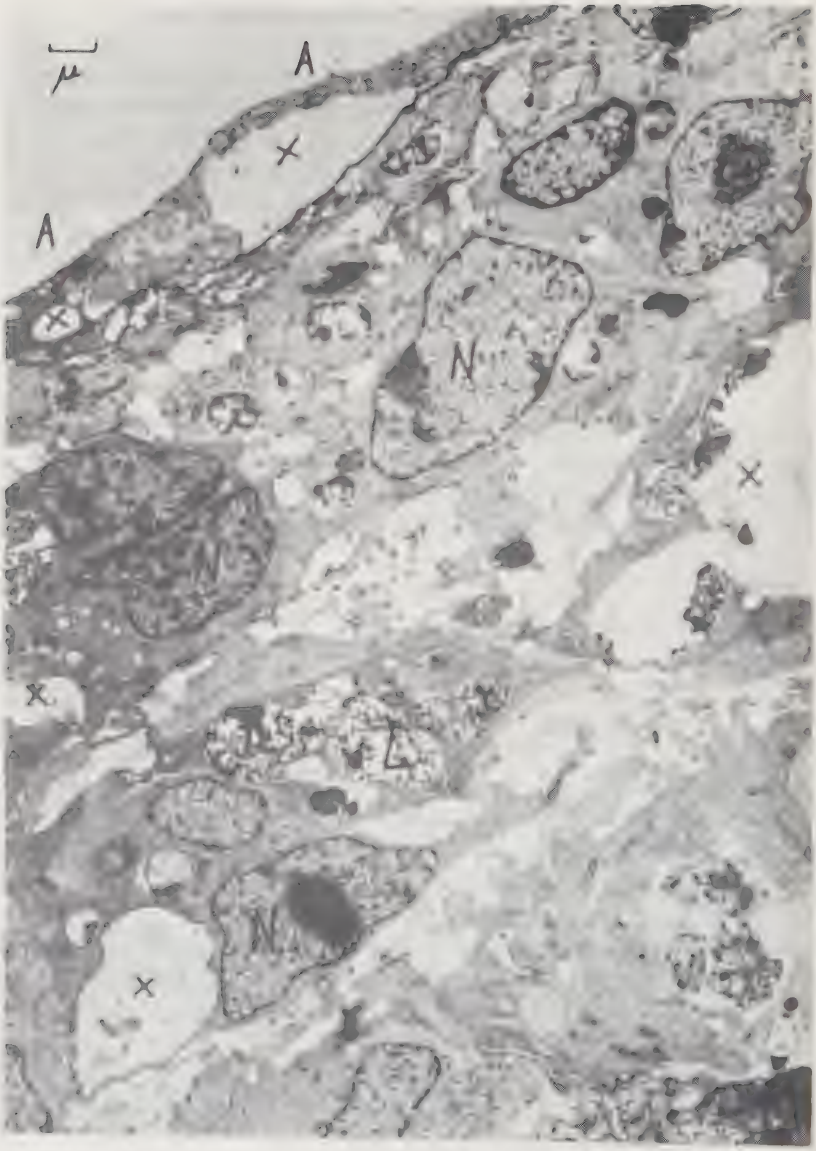
Abbildung 40
Vergrößerung 1 : 70 000. Ausschnitt aus Abbildung 39. Teile einer Mesenchymzelle bei hoher Vergrößerung mit deutlich geschwollenen Mitochondrien. Erweiterung der intrazellulären Hohlräume.

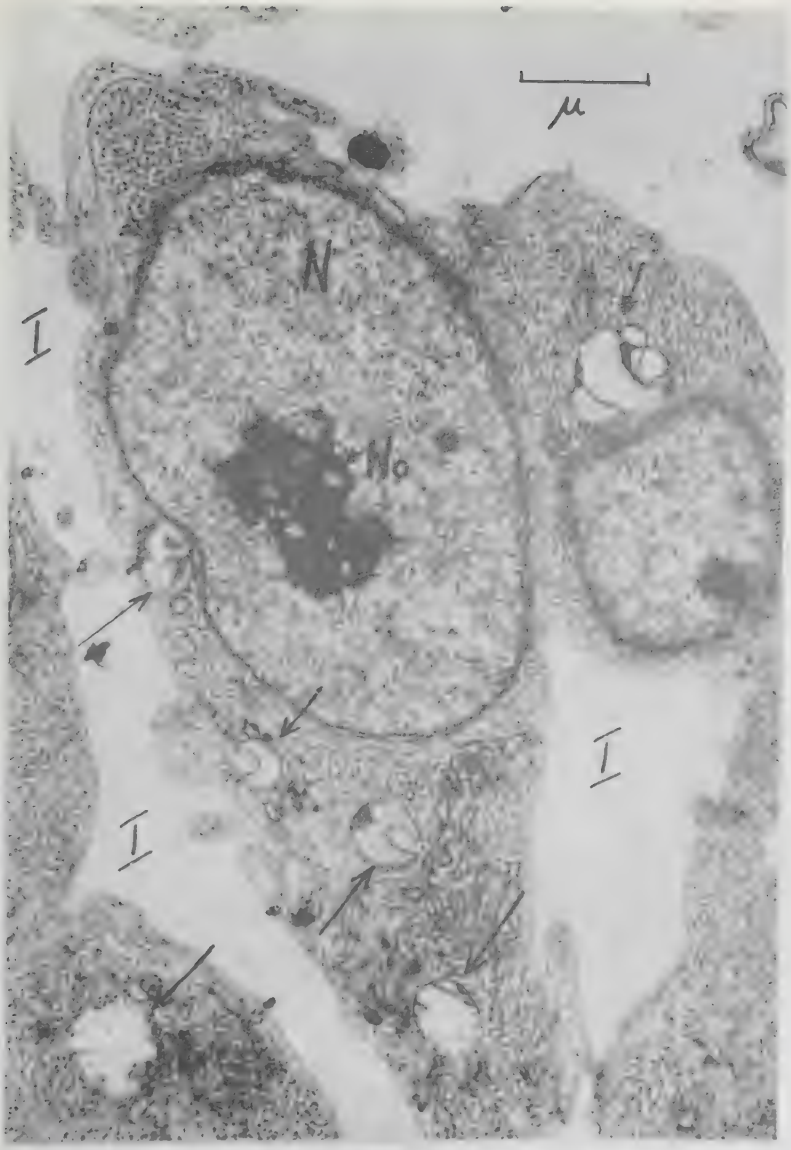
Abbildung 41
Vergrößerung 1 : 7000. Übersicht von der oberflächlichen Schicht eines 13 Tage alten Embryos nach 3 Stunden Inkubation in Serum. Man sieht Epithel (E), dicht gepackte Mesenchymzellen (M), endoplasmatischesReticulum (eR) und Cytolysomen (L).

Abbildung 42
Vergrößerung 1 : 21 000. Epithel des Neuralrohres. Mit leicht erweiterten Hohlräumen des eR (x), normale Mitochondrien (Mi), Zellmembran (Zm) und Nucleus (N).

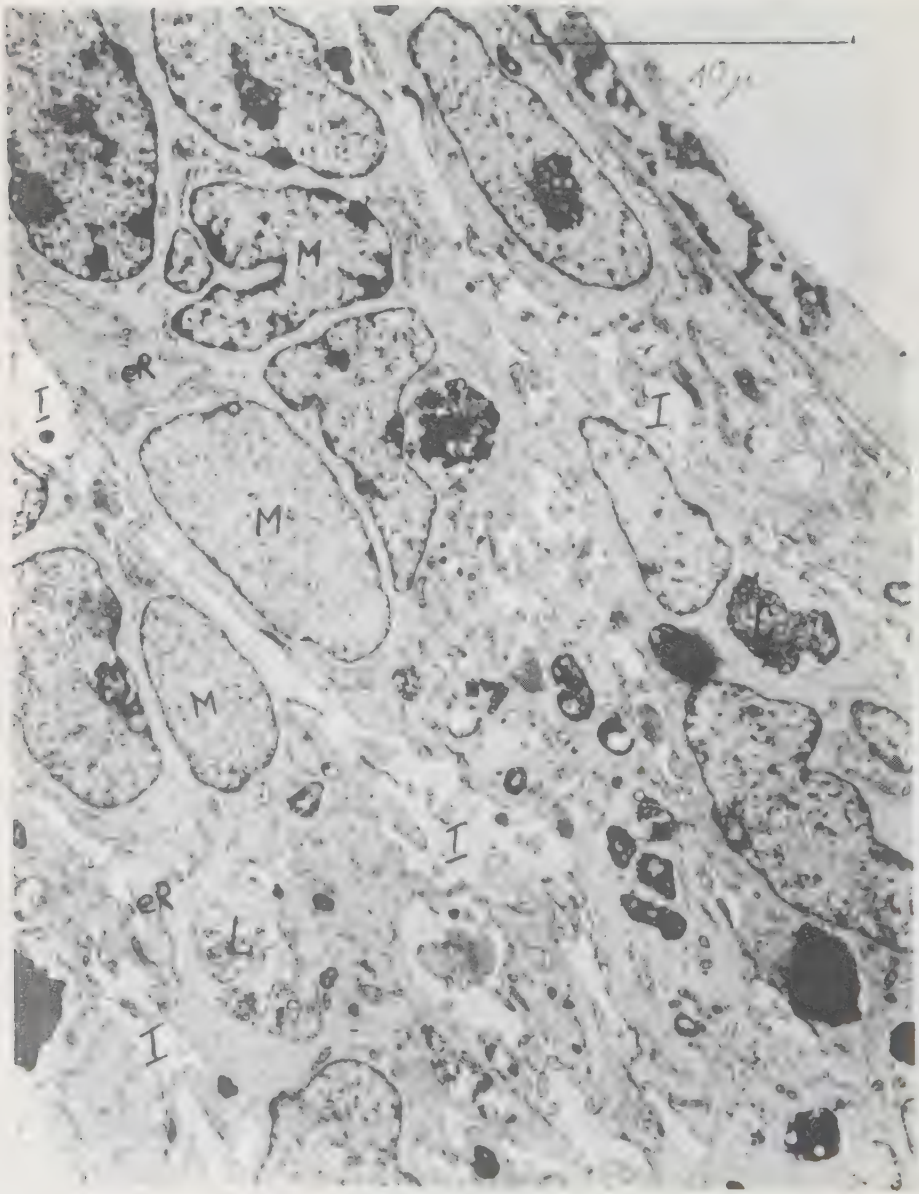
Abbildung 43
Vergrößerung 1 : 70 000. Hohe Vergrößerung der Epithelgewebsgrenze. Epithel (E), Mesenchymzelle (M), Basalmembran (Bm), Polysomen (O).

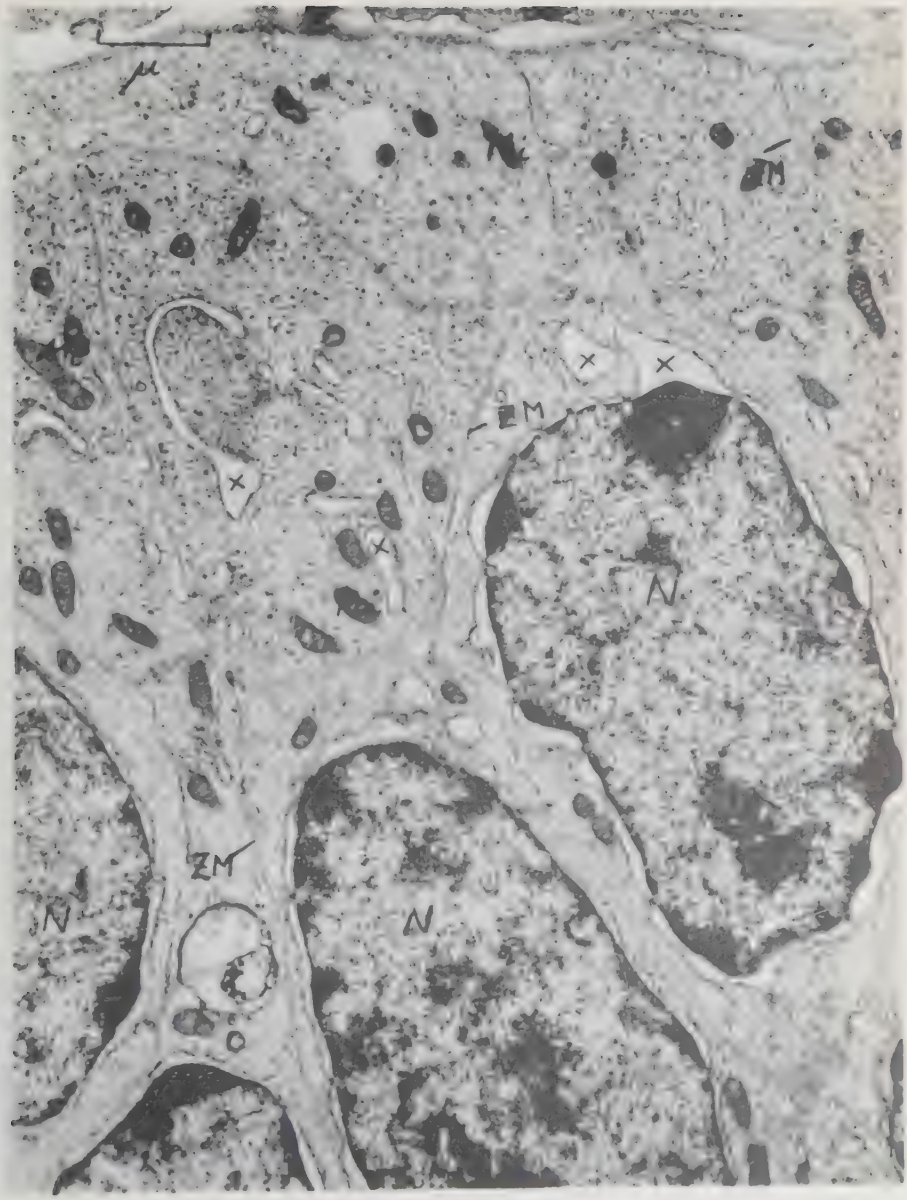
Die Aufnahmen einschließlich der Fixierung wurden unter der Leitung von Herrn Professor MERKER durchgeführt. Ihm sei an dieser Stelle für seine hilfreiche Unterstützung herzlich gedankt.

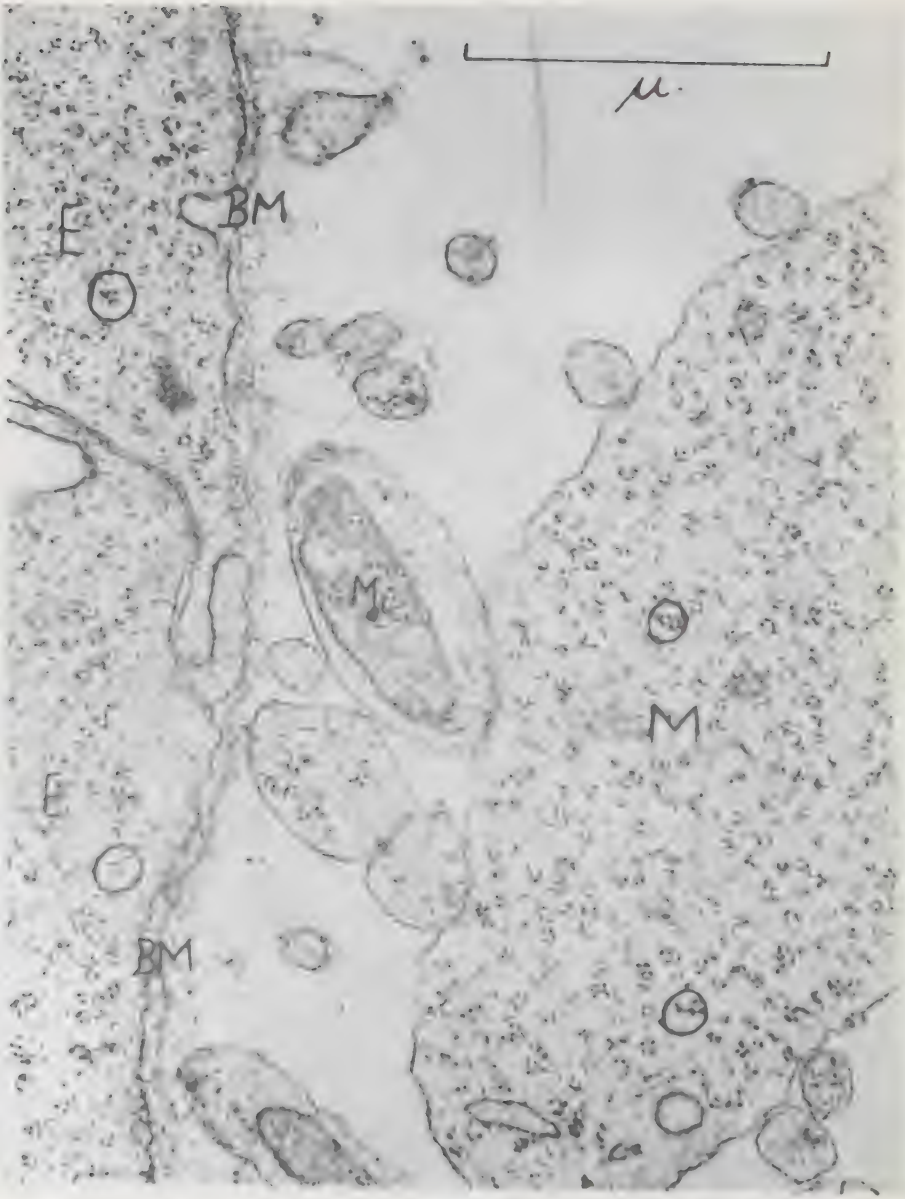

μ
A
A
N
N
N



400


1 µ
M
M
M
eR
eR
I
I
I
I
I


μ
ZM
ZM
ZM
N
N
N
D
D
D
X
X
X
X


μ.
E
BM
M
M
E
BM

in die Nucleinsäurefraktionen - eingebaut wird. Aus derselben Abbildung und den Abbildungen 32 und 35 kann man ersehen, daß auch Glucose - wie zu erwarten - über längere Zeiträume, mindestens bis zu 3 Stunden, in vitro in hochmolekulare Zellkomponenten eingebaut wird.

Vor der Diskussion dieser Abbildungen soll noch einmal darauf hingewiesen werden, wie bereits im Abschnitt "Methoden" erwähnt, daß die Inkubationen zunächst in einem Medium ausgeführt wurden, das aus etwas modifizierter Krebs-Ringer-Lösung, d.h. nur einer Salzlösung und Substrat bestand. Dies hat zwar den Vorteil, daß die Diffusion kleinmolekularer Bestandteile schneller vonstatten geht und so die Aufnahme in die Zellen leichter ermöglicht wird. Der Nachteil ist aber, daß die Zellen wesentlich stärker quellen und so unphysiologische Bedingungen vorherrschen. Diesen Nachteil kann man dadurch beheben, daß man statt der reinen Salzlösung gegen Krebs-Ringer-Lösung dialysiertes Rattenserum benutzt. Da für die entsprechenden Inkubationen mit Glucose bzw. P^{32} definierte spezifische Aktivitäten angewendet werden sollten, d.h. eine definierte Menge "kalter" Substanz zugegeben wurde (Glucose bzw. P^{32}), war eine Dialyse erforderlich. Der Unterschied bei Verwendung dieser beiden Inkubationsmedien ist nicht nur aus den Abbildungen 32 und 33 zu ersehen, die weiter unten diskutiert werden sollen, sondern vor allen Dingen aus den teils lichtmikroskopischen, teils elektronenoptischen Aufnahmen, die uns freundlicherweise von Herrn Professor Merker angefertigt und zur Verfügung gestellt wurden. Die Abbildungen 39 bis 40 zeigen Querschnitte durch einen 13 Tage alten Rattenembryo, der in einem Medium ohne Serum 3 Stunden inkubiert wurde. Die Abbildungen 41 bis 43 zeigen verschiedene Vergrößerungen und Ausschnitte aus 13 Tage alten Embryonen, die 3 Stunden in einem Medium inkubiert wurden, das aus dialysiertem Rattenserum mit Zusatz von 1 ‰ Glucose bestand. Man sieht deutlich, daß die Zellen - im Gegensatz zu der ersten Serie - nicht geschwollen sind. Die Mitochondrien zeigen eine durchaus normale Gestalt, man sieht reichlich endoplasmatisches Reticulum und eine große Anzahl von Polysomen. Alles läßt darauf schließen daß diese Zellen noch intakt sind. Auch biochemisch lassen sich keine Anhaltspunkte dafür finden, daß eine Schädigung im Zellstoffwechsel vorliegt.

Es ist geplant, diese Untersuchungen über längere Zeiträume auszudehnen und die Embryonen histologisch, morphologisch und biochemisch weiter zu untersuchen. Die Embryonen können anscheinend längere Zeit in vitro gehalten werden, ohne daß ein "Schädigungsstoffwechsel" auftritt (persönliche Mitteilung von Professor MERKER).

Verteilung der Radioaktivität auf die säureunlöslichen Fraktionen nach Markierung in vitro (Embryo 13 Tage)

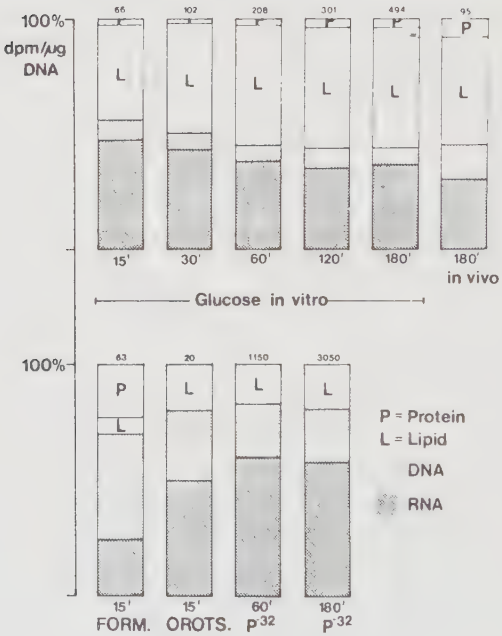


Abbildung 28

Bei den im oberen Teil der Abbildung dargestellten Versuchen wurden 13 Tage alte, intakte Rattenembryonen für die angegebenen Zeitspannen in vitro in Serum inkubiert, dem 1‰ Glucose mit 50 µCi/ml uniform C^{14}-markierter Glucose zugesetzt wurde. Die letzte Säule gibt zum Vergleich den Einbau von C^{14}-Glucose in vivo wieder (1 mCi/kg). Nach den angegebenen Zeiträumen wurden die Embryonen aus dem Inkubationsmedium entfernt und die Hauptzellkomponenten nach dem Säure-Laugen-Verfahren extrahiert. Die Lipidfraktion wurde vor der RNA extrahiert. Die kleinen Zahlen über den Säulen geben die Summe der Radioaktivität (dpm/µg DNA) in den säureunlöslichen Fraktionen wieder. Zum besseren Verständnis sind die Werte für die einzelnen Fraktionen als % der Gesamtaktivität angegeben.

Der untere Teil der Abbildung gibt zum Vergleich die Verteilung der Radioaktivität wieder, wie sie nach Anwendung einiger anderer Vorstufen erhalten wird. Die Versuche mit P^{32} wurden ebenfalls in Serum durchgeführt. Im Falle von Formiat und Orotsäure (beide C^{14}-markiert) wurden die Embryonen in Ringer-Lösung ohne Serumzusatz inkubiert. In den Versuchen mit Orotsäure stellt die Radioaktivität in der Lipidfraktion wahrscheinlich keine Markierung der Lipide dar, sondern ist auf eine Entfernung der säureunlöslichen Orotsäure zurückzuführen. Die %-Angaben für die Nucleinsäuren könnten sich daher etwas verschieben.

δ) Einbau von P^{32}.

Die Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse, die nach ein- bzw. dreistündiger Inkubation mit P^{32} (150 µCi/ml in Gegenwart von 0,15 M Phosphat) erhalten wurden. Bei einem Vergleich mit den in-vivo erhaltenen Werten sollte folgendes beachtet werden: In-vivo wurden 3 mCi/kg Tier appliziert, d.h. auf ein 200 g schweres Tier - oder wenn man das Blutvolumen mit 5 ml/Tier ansetzt, auf 5 ml - 600 µCi, bzw. 120 µCi /ml. Berücksichtigt man, daß das Blut etwa 6 bis 7 mg % anorganisches Phosphat enthält, d.h. rund 60 µg/ml, bzw. etwa 2 µMol/ml, so bedeutet das eine sofortige Verdünnung im Blut nach der intravenösen Gabe auf eine spezifische Aktivität von 60 µCi/µMol. Das Medium unserer in-vitro-Inkubation enthielt anorganisches Phosphat in einer spezifischen Aktivität von 1 µCi/µMol. Der In-vitro-Ansatz weist also nur $^1/_{60}$ der spezifischen Aktivität der In-vivo-Versuchsanordnung auf. Obwohl aber die spezifische Aktivität in vivo im Blut 60 mal höher ist, beträgt die Gesamtradioaktivität in den säureunlöslichen Fraktionen in vivo - auf DNA bezogen - nur etwa 15 % der in-vitro gefundenen Aktivität. Geladene Moleküle passieren also offensichtlich die Placentarbarriere nur sehr schlecht, ähnlich wie dies von von der Zellmembran im Falle des P^{32} bekannt ist. Besonders interessant erscheint uns ein Vergleich der prozentualen Aktivität in den einzelnen säureunlöslichen Fraktionen. Aus der Abbildung 28 ist zu ersehen, daß das Verhältnis der Markierung in-vitro in den einzelnen Fraktionen nach einer Stunde und nach drei Stunden nahezu identisch ist. Nach einer Stunde enthält die RNA-Fraktion 60 %, die DNA-Fraktion 23 %, die Lipid-Fraktion 17 %. Nach drei Stunden sind in der RNA-Fraktion 58 %, in der DNA-Fraktion 23 % und in der Lipid-Fraktion 19 % enthalten. Hierzu ist zu bemerken, daß die Proteinfraktion, die in-vivo zu weniger als 0,1 % markiert war, in-vitro messbar markiert ist. Da diese Markierung in der Proteinfraktion wahrscheinlich nicht einen Einbau in Proteine repräsentiert und entweder eine reine Adsorption oder aber - was wahrscheinlicher ist - eine unvollständige Extraktion der DNA darstellt, haben wir diesen Anteil zur DNA-Fraktion zugeschlagen. Ein Vergleich der in-vivo und der in-vitro gefundenen Werte scheint dieses auch zu bestätigen.

Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, ist die Aufnahme von Phosphat der Inkubationszeit direkt proportional.

Tabelle: Einbau von P^{32} in-vivo und in-vitro, 3 Stunden

	Lipid	RNA	DNA	Protein
in-vivo	22-24 %	54 %	24 %	0,1 %
in-vitro	17 %	60 %	23 %	

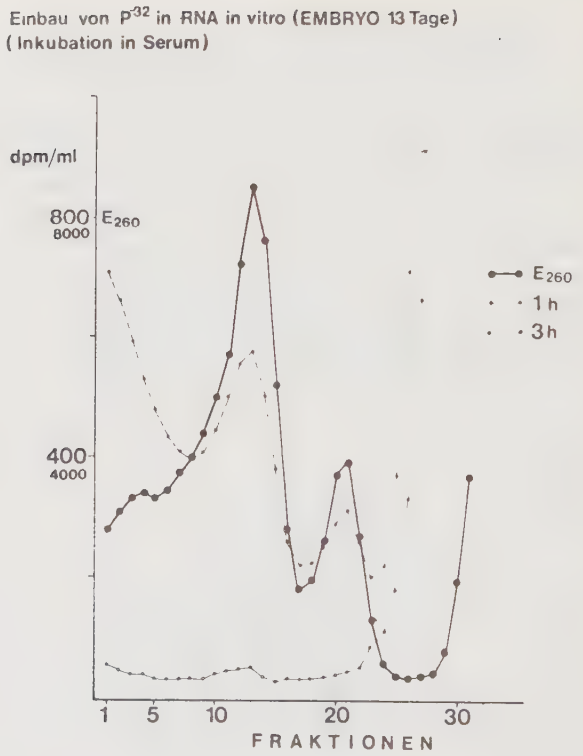


Abbildung 29

Intakte, 13 Tage alte Rattenembryonen wurden in vitro in Serum mit Zusatz von P^{-32} (150 µCi/ml, spezifische Aktivität 1 Ci/ Mol) inkubiert. Nach 1 bzw. 3 Stunden wurden die Embryonen aus dem Inkubationsansatz entfernt, in Mg^{++}-haltiger Saccharoselösung homogenisiert und die RNA nach der Phenolmethode isoliert. Die Abbildung zeigt das Resultat einer Saccharose-Gradienten-Zentrifugation (5:20 %, 0,3 ml eines 50%-igen Kissens). Die großen Zahlen auf der Ordinate geben die Extinktionswerte bei 260 nm wieder, die kleinen Zahlen die dpm/ml. Man kann erkennen, daß nach 1 Stunde die ribosomale RNA nur sehr geringgradig markiert ist. Beim 28 S Peak folgt der Verlauf der Radioaktivität jedoch der Extinktionskurve. Nach 3-stündiger Inkubation ist eine Markierung sowohl großmolekularer RNA als auch der ribosomalen 28 S- und 18 S-Komponente zu erkennen.

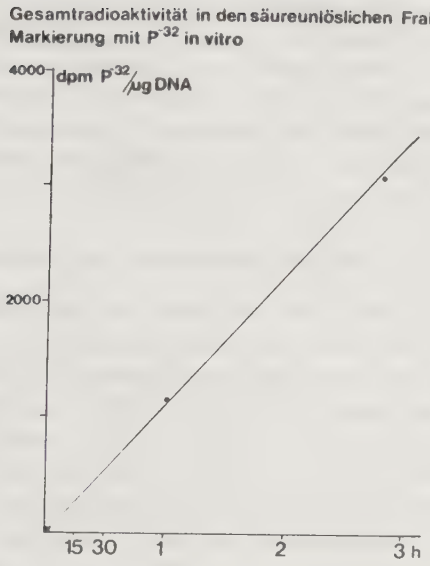


Abbildung 30

Gleiche Versuchsserie wie Abbildung 28. Auch der Einbau von P^{32} (vgl. Einbau von C^{14}-Glucose, Abbildung 31) erfolgt über einen Zeitraum bis zu 3 Stunden weitgehend linear.

Wenn es zutrifft, daß die embryonalen Zellen durch eine längere in-vitro Inkubation nicht oder nur wenig geschädigt werden (wie dies die morphologischen Befunde erwarten lassen), sollte man annehmen, daß die biochemischen Funktionen ebenfalls noch erhalten sind. Tatsächlich wird die ribosomale RNA noch nach dreistündiger Inkubation durch P^{32} hoch markiert (s. Abbildung 29). Die Radioaktivität folgt auch nach einer dreistündigen Inkubation in-vitro unter den angegebenen Bedingungen noch streng dem Verlauf der Extinktion im Saccharose-Gradienten ribosomaler Peaks. Hochmolekulare RNA ist ebenfalls nachweisbar. Nach einer Stunde ist weder in-vitro noch in-vivo eine wesentliche Markierung ribosomaler RNA zu demonstrieren.

ε) Einbau von C^{14}-Glucose (Säure-Laugen-Fraktionierung)

Die Aufnahme der Glucose in die säureunlöslichen Bestandteile der Zelle erfolgt praktisch direkt proportional zur Inkubationszeit, d.h., trägt man in einem Koordinatensystem die Impulsrate gegen die Zeit auf, so erhält man eine Grade (Abbildung 31). Dies scheint uns - wie schon im vorigen Abschnitt diskutiert - darauf hinzudeuten, daß die embryonalen Zellen in unseren Kulturen nicht oder nur wenig geschädigt sind. Die obere Hälfte der Abbildung 28 zeigt den zeitlichen Verlauf des Einbaus von 15 Minuten bis 3 Stunden in-vitro. Als Vergleich zur Markierung durch Glucose in-vivo dient die 6. Säule ganz rechts. Aus den Zahlen über den Säulen, die dpm x Min. ^{1} x g DNA ^{1} als Summe der säureunlöslichen Fraktionen wiedergeben, ist der kontinuierliche Einbau der Glucose über 3 Stunden ersichtlich. Aus der Abbildung geht ferner hervor, daß der prozentuale Anteil des Einbaus in die Hauptzellbestandteile, nämlich RNA, DNA, Lipid und Protein, sich in der gesamten Zeit nur unwesentlich ändert.

Aus der Abbildung 28 ist ersichtlich, daß nach kurzer Inkubationszeit bis zu etwa 30 Minuten die Nucleinsäurefraktionen prozentual etwas höher markiert sind als nach längerer Inkubationszeit. Die Markierungsrate in den Lipiden ist sehr hoch. Man kann sagen, daß durchschnittlich 50 % der Gesamtradioaktivität in den Nucleinsäurefraktionen gefunden wird. Das stimmt mit den Werten bei einer Markierung in-vivo durchaus überein. Allerdings ist festzustellen, daß bei einer Markierung in-vivo die Impulsrate in der Proteinfraktion höher ausfällt. Die Gesamtradioaktivität in den säureunlöslichen Fraktionen beträgt bei einer Markierung in-vivo nur etwa 20 % der in-vitro gefundenen Aktivität. Die Unterschiede sind auch diesmal noch deutlicher, wenn man berücksichtigt, daß die spezifische Aktivität im Inkubationsmedium in-vitro unter unseren Bedingungen, d.h. bei 0,1 % Glucose,

Gesamtradioaktivität in den säureunlöslichen Fraktionen nach Markierung mit C^{14}-Glukose in vitro

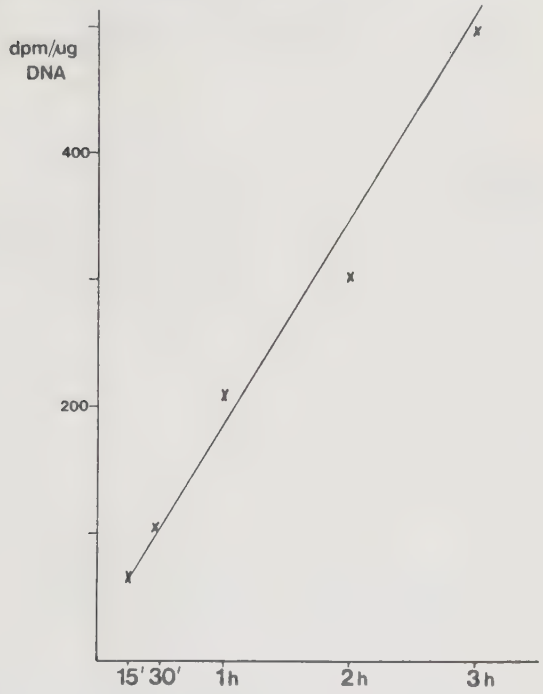


Abbildung 31

Gleiche Versuchsserie, wie Abbildung 32 . Der Einbau von Glucose in die säureunlöslichen Fraktionen erfolgt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit weitgehend linear. Vgl. den Einbau in die RNA, der nicht linear erfolgt (Abbildung 35).

Spezifische Aktivität in Nukleinsäuren nach Markierung mit C^{14} Glukose in vitro

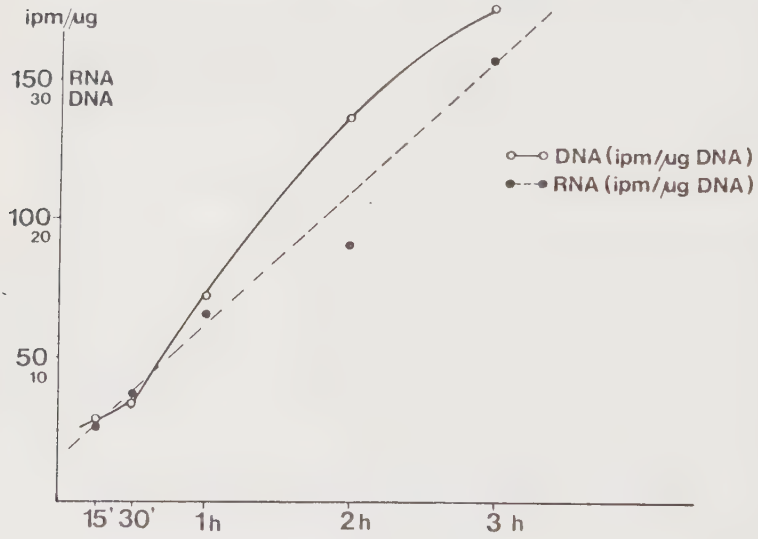


Abbildung 31a

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 31. Der Einbau in die Nucleinsäuren wurde mit der Säure-Laugen-Methode bestimmt. Der Einbau in die Summe der RNA-Komponenten erfolgt in Abhängigkeit von der Zeit bis zu 3 Stunden weitgehend linear. Auch im Falle der DNA kann etwa 2 Stunden lang ein nahezu linearer Einbau beobachtet werden, wenn man von den Verhältnissen in den ersten 30 Minuten nach Beginn der Inkubation absieht.

etwa 8,2 µCi/µMol beträgt. Wie in dem Kapitel Ca schon diskutiert, beträgt die Radioaktivität im Blut bei einer Dosierung von 1 mCi/kg und einem Blutvolumen von etwa 5 ml/Tier (200 g) und einer Glucosekonzentration von 80 bis 85 mg% etwa 7,5 µCi/µMol und liegt damit etwa genauso hoch wie bei den entsprechenden Bedingungen in-vitro.

ξ) Einbau von C^{14}-Glucose (Phenolmethode)

Während im vorigen Abschnitt die Ergebnisse der kombinierten Säure-Laugen-Fraktionierung diskutiert sind, d.h. der Methode, die in relativ kurzer Arbeitszeit einen Überblick über die Markierung in den säureunlöslichen Zellkomponenten gibt, sollen in diesem Abschnitt die Ergebnisse besprochen werden, die nach der Phenolmethode in der RNA gefunden wurden. Wie weiter oben schon erwähnt, sind zwei verschiedene Inkubationsmedien verwandt worden. Die Medien unterscheiden sich einmal dadurch, daß das eine (s. Abbildung 32) dialysiertes Rattenserum enthielt, während das andere (s. Abbildung 33) nur aus einer Salzlösung (Krebs-Ringer) bestand. Aus Abbildung 33 ist zu ersehen, daß die Markierung der Nucleinsäuren in dem Ansatz ohne Serum sehr schnell erfolgt. Dieser Versuchsansatz erlaubt daher Kurzzeitversuche im Minutenbereich. Daß Aktivität an die hochmolekulare RNA adsorbiert ist und uns damit ein hoher Einbau vorgetäuscht wird, ist durch die 0-Zeit-Werte ausgeschlossen. Aus dieser Kurve ist aber auch ersichtlich, daß der Einbau von Glucose in die RNA sehr schnell vor sich gehen muß, da eine - wenn auch geringe - Impulsrate schon nach 20 bis 30 Sekunden (so lange dauert das Stoppen des Nullwertes, d. h. der Nullwert "repräsentiert" einen Wert von 20 bis 30 Sekunden) in einer sehr hochmolekularen Form vorhanden ist. Die Abbildung zeigt auch, daß die Einbaureaktion durch Actinomycin D (20 µg/ml) hemmbar ist. Auch diese Kurve läßt erkennen, daß der Einbau der Glucose in die RNA sehr schnell vor sich gehen muß. In den hochmolekularen Komponenten der RNA findet sich wieder eine beträchtliche Aktivität. Da die Reaktion durch Zugabe der Embryonen in das Inkubationsmedium gestartet wurde, konnte Glucose bereits in die RNA eingebaut werden, bevor die RNA-Polymerase durch Actinomycin geblockt wurde. Dies kann verhindert werden, wenn die Embryonen mit dem Actinomycin wenige Minuten vorinkubiert werden, und der Einbau durch Zugabe der radioaktiven Glucose gestartet wird. Wie die Abbildung 33 zeigt, ist ein Einbau der Glucose besonders in die hochmolekulare RNA über lange Zeit festzustellen. Selbst nach 1 Stunde folgt die Markierung nicht dem "pattern" der optischen Dichte. Für Langzeitversuche wurde deshalb das serumhaltige Medium bevorzugt.

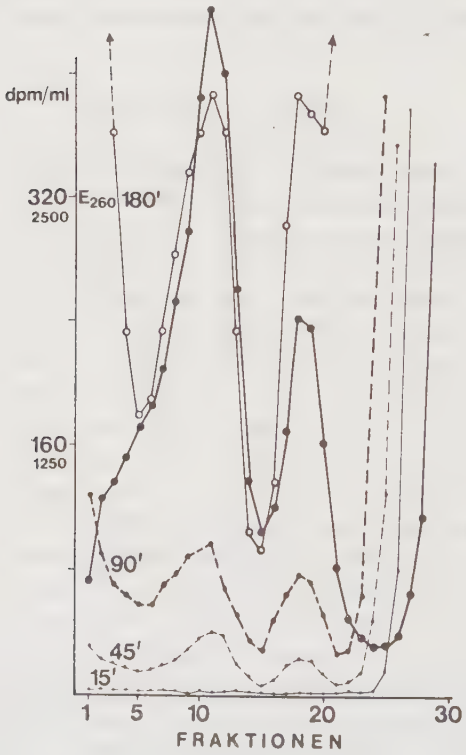


Abbildung 32

13 Tage alte, intakte Rattenembryonen wurden in vitro in Serum inkubiert. Das Medium enthielt 1 ‰ Glucose mit 50 µCi/ml uniform C^{14}-Glucose. Nach verschiedenen Zeiten (15 bis 180 Minuten) wurden die Embryonen dem Medium entnommen, homogenisiert, die RNA nach der Phenolmethode extrahiert und im Saccharosegradienten aufgeschlüsselt. Auf der Ordinate gibt die große Schrift die Extinktion bei 260 nm wieder. Der Verlauf der Extinktion wird durch die großen schwarzen Kreise dargestellt.

Während nach 15-minütiger Inkubation noch keine wesentliche Markierung ribosomaler Komponenten zu erkennen ist, kommt es von 45 Minuten an zu einem zunehmenden Einbau in die 28 S- bzw. 18 S-Komponente der ribosomalen RNA. Eigenartigerweise nimmt der Einbau in die ribosomalen Komponenten nicht gradlinig zu. Dieses Verhalten geht besonders aus der Abbildung 35 hervor, in der die Markierung der 28 S-Komponente in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgetragen ist.

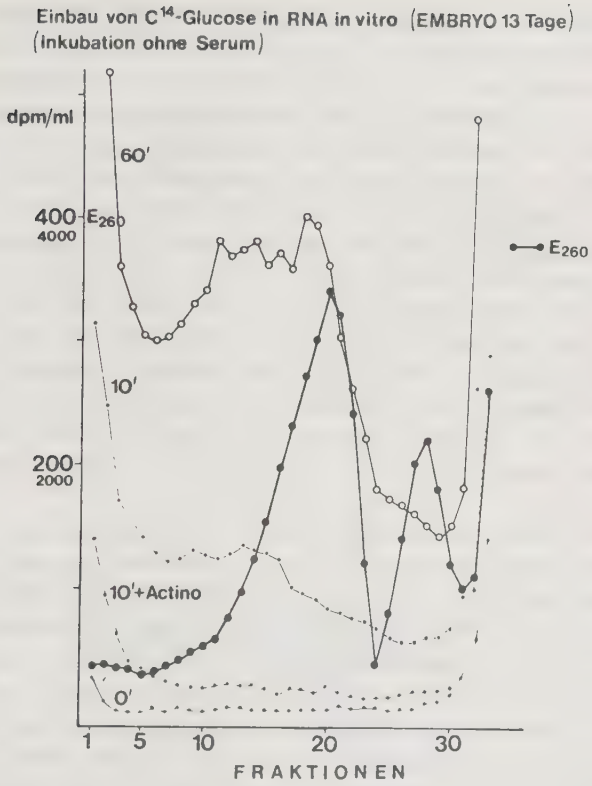


Abbildung 33

Die Versuchsbedingungen sind denen in Abbildung 32 vergleichbar. Jedoch wurden die intakten Embryonen in vitro in einer Ringer-Lösung ohne Zusatz von Serum inkubiert (20 µCi/ml). In dem Ansatz ist - im Gegensatz zu der Inkubation in Serum - nach 10 Minuten bereits ein deutlicher Einbau in die RNA nachzuweisen. Nach 60 Minuten sind die großmolekularen RNA-Anteile hoch markiert, auch die 28 S-Komponente der ribosomalen RNA zeigt offenbar eine Markierung. In der Abbildung ist ebenfalls ein 0-Wert eingetragen, bei dem der Versuchsansatz zur 0-Zeit (etwa 30 Sekunden) abgestoppt wurde. Eine Adsorption der Radioaktivität an RNA-Komponenten kann hierdurch ausgeschlossen werden. Die Abbildung gibt weiterhin den Einfluß eines Zusatze von 20 µg/ml Actinomycin wieder. Actinomycin ist nicht in der Lage, unter den gewählten Versuchsbedingungen den Einbau vollständig zu verhindern. Da Actinomycin und C^{14}-Glucose gleichzeitig zugesetzt wurden, ist zu erwarten, daß die kleinmolekulare Glucose besser in den Embryo übertritt als das große Actinomycin-Molekül. Vor Ausbildung einer hochgradigen Hemmung konnte also bereits etwas Glucose eingebaut werden. Da besonders auf die Trennung Großmolekularer RNA Wert gelegt wurde, erfolgte die Trennung im Saccharose-Gradienten etwas anders als in den meisten der bisher dargestellten Versuchsserien. Saccharose-Gradient: 5:40 %, 0,3 ml 50%-iges Kissen, Zentrifugation 5 Stunden lang bei 41.000 Umdrehungen/Minute im SW 41 Rotor der Spinco Ultrazentrifuge.

Die Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Versuche, bei denen die Embryonen in Serum inkubiert wurden. Es ist festzustellen, daß nach 15 Minuten unter diesen Bedingungen kein Einbau in die ribosomale und in die hochmolekulare RNA gefunden wurde. Nach ungefähr $^1/_2$ Stunde folgt die Markierung etwa der optischen Dichte. Es wird also radioaktiv markierte Glucose nach $^1/_2$ Stunde in der ribosomalen RNA gefunden. Gleichzeitig steigt die Markierung in den hochmolekularen Komponenten an. Die spezifische Aktivität nimmt mit zunehmender Zeit der Inkubation in der ribosomalen RNA zu. Die spezifische Aktivität in den ribosomalen RNA-Komponenten liegt aber immer unter den Werten, die mit Hilfe der Säure-Laugen-Fraktionierung gefunden werden. Dies ist auch zu erwarten, da mit der Säure-Laugen-Fraktionierung die Gesamt-RNA bestimmt wird. Aus der Abbildung 32 geht hervor, daß die höchste Markierung und die höchste spezifische Markierung zunächst in der hochmolekularen RNA gefunden wird. Mit zunehmender Zeit werden dann auch Komponenten markiert, die kleiner als 18 S sind. Die Werte für die spezifische Aktivität, die mit diesen beiden Methoden ermittelt werden, müssen sich also stark unterscheiden.

Daß die hohe Impulsrate in der hochmolekularen RNA aus der DNA stammt, ist unwahrscheinlich. Es sind mehrfach Versuche durchgeführt worden, in denen die DNA mit radioaktivem Thymidin markiert und die Aktivität in der RNA bestimmt wurde. Ein Beispiel dafür stellt die Abbildung 34 dar. Auch die Verunreinigung durch Proteinreste bzw. an die RNA gebundenes Protein ist praktisch zu vernachlässigen (s. Abbildung 34). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß ein Teil dieser hochmolekularen Komponenten aus DNA-RNA-Hybriden besteht. Diese sind jedenfalls bis zu einem gewissen Grade gegen DNasen unempfindlich. Es steht jedoch außer Zweifel, daß der größte Teil dieser Komponenten aus hochmolekularer RNA besteht. Dies sollte man auch erwarten, da die RNA-Extraktion mit dem Homogenat durchgeführt wurde und keine Zellfraktionierung stattfand. Nach SCHERRER und DARNELL (84), PENMAN (75) und WEINBERG (104) ist zu erwarten, daß sich ribosomale RNA aus hochmolekularen Vorstufen bildet. Außerdem soll "messenger"-RNA ebenfalls hochmolekular sein (SEKERIS et al. 49). Zwar ist dieses für Embryonalgewebe noch nicht gezeigt worden, jedoch wäre es überraschend, wenn diese Vorstellung für Embryonalzellen nicht gelten würde. Die Abbildung 32 zeigt allerdings keine Markierung in den hochmolekularen Komponenten nach 15 Minuten und erst zusammen mit dem Auftreten einer Radioaktivität in der ribosomalen RNA den Beginn der Markierung in den hochmolekularen Komponenten. Dies ist überraschend, da man erwarten würde, daß zunächst die hochmolekularen Komponenten markiert sein müßten, bevor eine Markierung in der ribosomalen RNA auftritt. Es wird allerdings von sämtlichen Autoren, die sich mit der Isolierung

Ausschluß einer Verunreinigung der isolierten RNA mit DNA oder Protein durch H^3-Thymidin bzw. H^3-Leucin (EMBRYO 13 Tage)

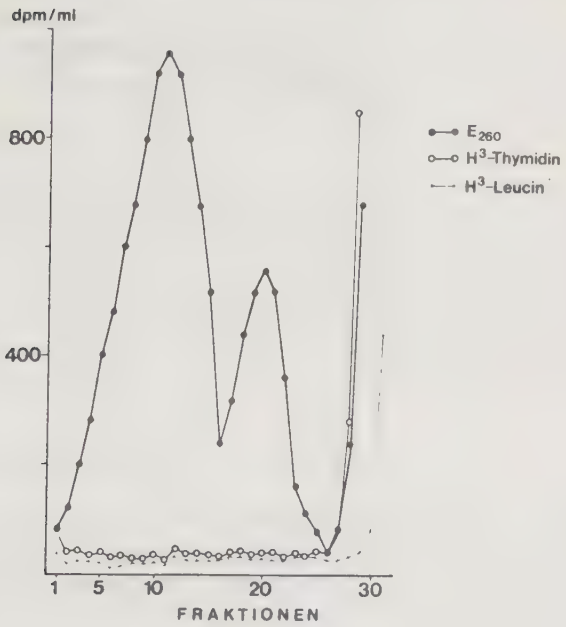


Abbildung 34

Je 2 Tiere erhielten am Tag 13 der Schwangerschaft 3 mCi/kg Thymidin bzw. H_3-Leucin intravenös injiziert. 3 Stunden später wurden die Embryonen herauspräpariert, homogenisiert, die RNA nach der Phenol-Methode isoliert und im Saccharose-Gradienten (5:20 % mit 0,3 ml eines 50%-igen Kissens) aufgetrennt.

Die RNA-Fraktionen zeigen keine Markierung durch H_3-Thymidin bzw. H_3-Leucin. Eine Adsorption dieser Verbindungen an die RNA kann genauso ausgeschlossen werden, wie eine Verunreinigung der verschiedenen RNA-Fraktionen durch DNA oder Protein. Unter den gewählten Versuchsbedingungen ist sowohl die DNA-Fraktion als auch die Protein-Fraktion sehr hoch radioaktiv markiert.

Abbildung 35

Versuchsbedingungen wie in Abbildung 32 wiedergegeben. Unter den Bedingungen in vitro erfolgt der Einbau in die 28 S-Komponente nicht linear. Da (s. Abbildung 31) der Einbau in die Summe der säureunlöslichen Fraktionen durchaus eine lineare Abhängigkeit zeigt, könnte der Befund für die Zwischenschaltung einer anderen RNA-Komponente (großmolekulare RNA ?) sprechen.

hochmolekularer Vorstufen der ribosomalen RNA befaßt haben, immer wieder darauf hingewiesen, daß diese großmolekulare RNA außerordenflich empfindlich gegenüber RNasen sind. Da es uns bei unseren Untersuchungen zunächst auf diese Vorstufen weniger ankam, sondern wir größeren Wert auf eine hochgereinigte, relativ stabile ribosomale RNA legten, ist es durchaus möglich, daß diese Vorstufen bei unseren Isolierungsverfahren durch endogene RNasen zerstört wurden.

Die in-vitro-Versuche zeigen also, daß RNA mit allen Precursoren, die auch in-vivo zur Markierung geeignet sind, in genügend hohem Maße markiert werden kann. Wir haben hiermit eine zweite Methode, die es gestattet, gewisse Stoffwechselschritte im embryonalen Gewebe zu erfassen. Durch die Wahl geeigneter Precursoren ist es daher möglich, die Einflüsse verschiedenster Pharmaka auf das embryonale Gewebe an den verschiedensten Stellen im intermediären Stoffwechsel zu erfassen bzw. zu lokalisieren.

η) Langzeit-in-vitro-Inkubationen mit der Trowelkultur.

Nach einer persönlichen Mitteilung von Herrn Professor MERKER sind nach sechsstündigem Inkubieren in den von uns verwendeten "Submers-Kulturen" morphologische Veränderungen der Zellstruktur erkennbar. Es sind deshalb in seinem Labor Methoden entwickelt worden, die es gestatten, embryonales Gewebe über viele Stunden (mehr als 24) am "Leben" zu erhalten. In Zusammenarbeit mit dieser Arbeitsgruppe ist von uns versucht worden, den Stoffwechsel dieser Embryonen in den letzten Stunden der Inkubation näher zu charakterisieren.

Die Embryonen (Tag 11) wurden auf ein Membran-Filter gelegt, das sich auf der Oberfläche des Nährmediums befand. Die Inkubationsdauer betrug 10 bis 50 Stunden. In den letzten 3 Stunden wurde das Medium gewechselt und C^{14}-markierte Glucose zugegeben.

Die Abbildungen 36 und 37 zeigen die Ergebnisse nach Phenolextraktion und Gradientenzentrifugation. Es ist zu sehen, daß die Aktivitätskurve parallel zur optischen Dichte verläuft. In den früheren Abschnitten ist schon darauf hingewiesen worden, daß sich der DNA-Gehalt des Embryos vom Tag 11 zum Tag 12 versiebenfacht, d.h. daß der Stoffwechsel in dieser Phase des Embryos besonders hoch ist. Selbst nach langer Vorinkubation (11 bzw. 24 bis 25 Stunden) ist die Einbaurate in die RNA hoch. Die

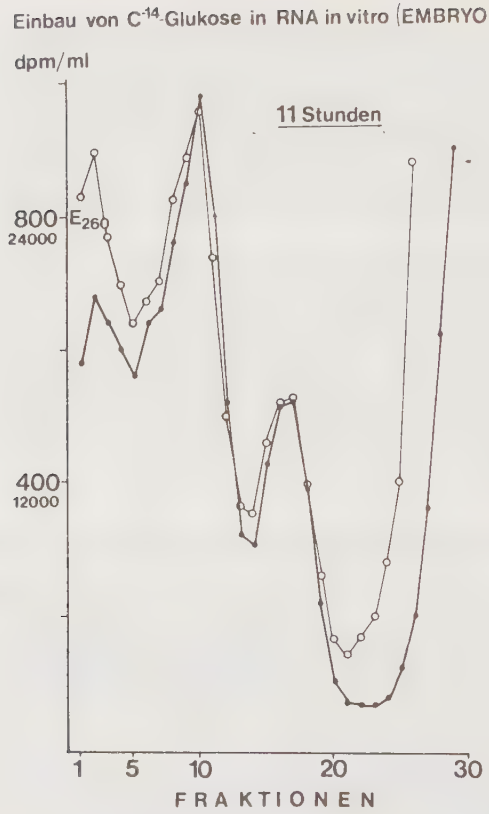


Abbildung 36

Intakte 11 Tage alte Rattenembryonen wurden in vitro 8 Stunden in einer Trowel-Kultur gehalten. Anschließend erfolgte eine 3-stündige Inkubation in einem C^{14}-Glucose-haltigen Medium. Versuchsbedingungen sonst wie in Abbildung 37.

Die Embryonen sind noch stoffwechselaktiv. Es ist eine Synthese von ribosomalen RNA-Komponenten zu erkennen.

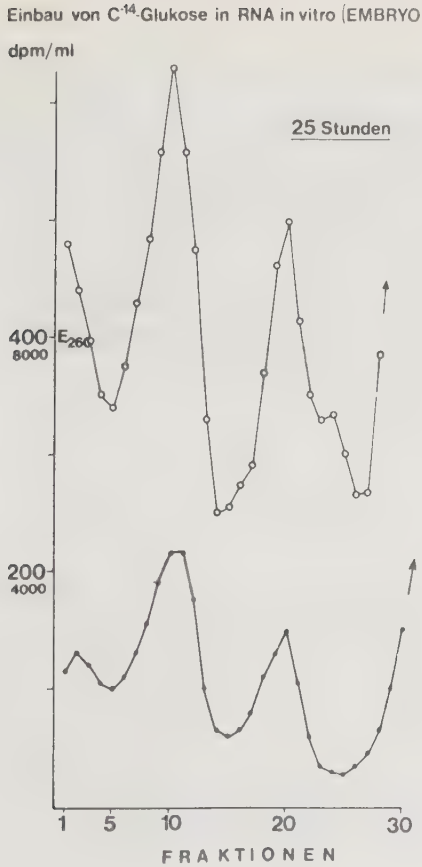


Abbildung 37

11 Tage alte Rattenembryonen wurden in vitro in einer Trowel-Kultur inkubiert. Der Ansatz enthielt 0,1 % inaktive Glucose. Nach 22-stündiger Inkubation wurden die Embryonen in ein anderes Inkubationsmedium überführt, das 0,05 % Glucose enthielt, dem 100 µCi/ml uniform C^{14}-markierter Glucose zugesetzt waren.

Nach 3-stündiger Inkubation in dem C^{14}-Glucose-haltigen Medium wurden die Embryonen in Mg^{++}-haltiger Saccharoselösung homogenisiert, die RNA nach der Phenol-Methode isoliert und im Saccharose-Gradienten aufgeschlüsselt.

Auf der Ordinate geben die großen Zahlen die Extinktionswerte bei 260 nm wieder. Die Kurve mit den schwarzen Punkten gibt die Extinktionskurve wieder. Die kleine Schrift auf der Ordinate bezieht sich auf die dpm/ml. Der Verlauf der radioaktiven Markierung entspricht der Kurve mit den offenen Kreisen.

Man kann erkennen, daß die Rattenembryonen auch noch nach einer 22-stündigen Inkubation in vitro in einer Trowel-Kultur stoffwechselaktiv sind und Ribosomen und ribosomale RNA in einem hohen Ausmaß synthetisieren. Es ist bei der Interpretation dieser Kurve zu beachten, daß zur radioaktiven Markierung ribosomaler Komponenten mit Hilfe von Glucose eine große Zahl von Stoffwechselschritten notwendig sind, die offenbar unter den extremen Bedingungen in vitro noch ablaufen. Nach 25-stündiger Inkubation in vitro hat das Herz der Embryonen noch geschlagen. Der DNA-Gehalt ist von den Embryonen während dieser 24-stündigen Inkubation allerdings nicht wesentlich vermehrt worden.

spezifische Aktivität in der ribosomalen RNA (28 S) beträgt für den 11-Stunden-Wert - wie erwähnt, wurde nur die letzten 3 Stunden mit radioaktiver Glucose inkubiert - 765 dpm/µg RNA. Der entsprechende Wert für den 25-Stunden-Versuch beträgt etwa 1400 bis 1500 dpm/µg RNA. Es ist auf den ersten Blick überraschend, daß bei gleicher Inkubationsdauer (3 Stunden) in Gegenwart von radioaktiver Glucose ein so unterschiedlicher Einbau in die RNA erfolgt ist. Man sollte eigentlich erwarten, daß die spezifische Aktivität entweder gleich ist oder aber - was aus zwei Gründen wahrscheinlicher wäre - in dem Langzeitversuch geringer:

1. weil die RNA- bzw. DNA-Zunahme mit zunehmendem Alter des Embryos geringer wird (jedenfalls in dieser Phase der Entwicklung) und
2. weil der Stoffwechsel mit zunehmender Verlängerung der Versuchsdauer geschädigt und damit geringer werden könnte.

Morphologische Untersuchungen können uns eine Erklärung dieses biochemischen Befundes geben.

Der Embryo verändert sein "Haut"-Epithel, und die Zellen wachsen bei längerer Inkubation in das Membranfilter hinein. Dadurch wird die Permeation der Glucose und vielleicht auch die Diffusion für die Substrate verbessert.

Aus diesen Versuchen läßt sich ableiten, daß der Embryo offensichtlich in der Lage ist, selbst nach 24-stündiger in-vitro-Inkubation die vielen Stoffwechselschritte durchzuführen, wie sie zum Einbau von Glucose in hochmolekulare Zellbausteine - wie beispielsweise Nucleinsäuren - notwendig sind. Es spricht vieles dafür, daß der Embryo noch "lebt", zumal noch nach 24 Stunden ein Herzschlag nachweisbar ist.

Bei der hohen Wachstumsrate von 11 Tage alten Embryonen wären aber unter normalen Bedingungen, d.h. im Muttertier, von Tag 11 zu Tag 12 eine Versechs- bis Versiebenfachung des Gewichtes und im Durchschnitt etwa 3 Mitosen aufgetreten. Wir haben daher den RNA- und DNA-Gehalt vor und nach der Inkubation bestimmt. Obwohl eine hohe Einbaurate von Glucose in Nucleinsäuren stattgefunden hat, war eine nennenswerte Zunahme an diesen Zellkomponenten nicht nachweisbar. Die Zunahme betrug nach 25-stündiger Inkubation für die DNA beispielsweise 20 %. Es ist allerdings sehr schwierig die Embryonen, die - wie schon erwähnt - etwas in die Membran hineingewachsen sind, nach der Inkubation quantitativ in die Bestimmung einzusetzen. Jedoch scheint es unwahrscheinlich, daß sich die Hauptmenge des Gewebes in der Membran befindet.

Es ist hingegen durchaus möglich, daß hauptsächlich die Zellschichten stoffwechselaktiv sind, die der Membran zugekehrt sind und dadurch leichter ernährt werden können. Die Zuführung der zur Ernährung notwendigen Substrate und die Abführung der nicht benötigten Stoffwechselprodukte erfolgt in diesem System durch reine Diffusion. Es ist leicht einzusehen, daß Zellen, die einen verhältnismäßig "weiten" Weg zum Medium haben, leichter an ihren eigenen Stoffwechselprodukten "ersticken".

Ein genaueres Bild über die Verteilung radioaktiver Substanzen könnten autoradiographische Untersuchungen ergeben. Derartige Experimente werden zur Zeit durchgeführt. Man könnte für Langzeitversuche die Versuchsanordnung sicherlich günstiger gestalten, wenn für einen kontinuierlichen Zustrom und Abfluß des Mediums während der gesamten Zeit gesorgt würde.

Die oben genannten Bedenken gegen eine in allen Zellschichten gleichmäßige Versorgung des Gewebes per diffusionem in der Trowel-Kultur könnte man auch erheben aus einem Vergleich der spezifischen Aktivitäten der ribosomalen RNA nach dreistündiger Inkubation von 13 Tage alten Embryonen in serumhaltigem Medium (Abbildung 32), mit den Werten, die in der Trowel-Kultur nach 11 bzw. 25 Stunden Inkubationszeit gewonnen wurden. Die spezifische Aktivität betrug dort etwa 200 dpm /µg RNA für den 28-S-Peak, bei 11 Stunden-Trowel-Kultur 765 dpm/µg RNA, bei 25 Stunden 1400 bis 1500 dpm/µg RNA. Man muß bei diesem Vergleich die spezifische Aktivität der Glucose in den Inkubationsmedien berücksichtigen: ca. 8 µCi/µMol bei den "submers"-Kulturen, etwa 30 µCi/µMol in der Trowel-Kultur. Bei gleicher spezifischer Aktivität des Precursors in beiden Versuchsanordnungen wäre also die spezifische Aktivität in der ribosomalen RNA praktisch gleich hoch. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Altersstufen der Embryonen müßte aber ein Faktor um 6 resultieren.

Ganz anders sieht es bei dem 25-Stunden-Wert aus. Diese Embryonen (gleiche Stoffwechsellage wie in-vivo vorausgesetzt) würden etwa 12 Tage-Embryonen entsprechen, wären also etwa viermal so stoffwechselaktiv wie 13 Tage alte Embryonen. Bei gleicher spezifischer Aktivität des Substrates sind die Embryonen nach 25 Stunden in der Trowel-Kultur immerhin doppelt so aktiv wie 13 Tage alte Embryonen. Man käme dem zu erwartenden Wert also schon recht nahe.

Nach den bisher angestellten Versuchen erscheint es durchaus lohnend, diese in-vitro-Kultur von Embryonen weiter zu entwickeln und diese Versuchsanordnung dazu zu benutzen, den Effekt von Pharmaka zu studieren.

I) Schlußfolgerungen

Die hier vorgelegten Resultate zeigen, daß es durchaus möglich ist, auch in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung von Säugetiergewebe eine Markierung mit bestimmten radioaktiven Metaboliten zu erreichen. Durch die Auswahl geeigneter radioaktiv markierter Vorstufen ist es möglich, entweder bevorzugt Nucleinsäuren, Lipide oder Proteine zu markieren. Somit ist es möglich, einen genügend hohen Einbau intravenös applizierter, radioaktiv markierter Metaboliten in alle Hauptzellbestandteile zu messen. Damit kann der Einfluß verschiedener Pharmaka auf bestimmte Stoffwechselwege des embryonalen Gewebes auch in vivo untersucht werden. Besonders interessierte der Nucleinsäurestoffwechsel während der schnellen Wachstums- und ausgeprägten Differenzierungsphase. Es bereitet nach den bisher durchgeführten Untersuchungen keine größeren Schwierigkeiten, radioaktiv markierte Vorstufen in sämtliche RNA-Komponenten der embryonalen Zelle einzubauen.

Drei weitere Aspekte des embryonalen Nucleinsäurestoffwechsels können nach diesen Voruntersuchungen bearbeitet werden, entsprechende Experimente wurden bereits begonnen:

1.) Ist es möglich, vergleichende Untersuchungen über den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in verschiedene Abschnitte des Embryo anzustellen. Da bei Verwendung von C^{14}-Glucose und P^{32} - unserem Routineverfahren - am Tag 11 nur 10 - 12 Embryonen für eine Untersuchung benötigt werden, kann eine Untersuchung von Fragmenten des Embryo, die etwa $^1/_{10}$ seiner gesamten Masse ausmachen, leicht mit 8 - 10 schwangeren Tieren durchgeführt werden. Diese Verfeinerung der Technik würde es gestatten, den Einfluß bestimmter embryotoxischer Pharmaka auf bestimmte Abschnitte des Embryo, die sich gerade in einer intensiven Differenzierung befinden, zu untersuchen.

2.) Die Frage betrifft den Einbau in die verschiedenen RNA-Komponenten. Als Modell wurde zunächst bewußt die ribosomale RNA gewählt, weil sie klar überschaubare Versuchsbedingungen ergibt. Die Technik der Gradientenzentrifugation oder auch eine Auftrennung über Polyacrylamidgel konnte von uns soweit erarbeitet werden, daß es nun möglich ist, auch sämtliche anderen RNA-Komponenten - vor allem auch die großmolekularen - in ähnlicher Weise zu untersuchen, wie es für die ribosomale RNA geschehen ist.

Durch Einsetzen entsprechender gereinigter RNA-Fraktionen in zellfreie, proteinsynthetisierende Systeme wird es dann möglich sein, nähere Anhaltspunkte über die Eigenschaften dieser RNA zu erhalten und zu der Frage Stellung zu nehmen, ob es sich z.B. um "messenger"-artige RNA-Fraktionen oder Vorstufen ribosomaler Komponenten handelt. Das Endziel muß natürlich die Synthese eines spezifischen Proteins, am besten eines Enzyms in einem zellfreien, proteinsynthetisierenden System mit einer derartigen RNA-Fraktion darstellen.

3.) Diese Art von Untersuchungen, die nach den Erfahrungen der vorliegenden Studien möglich und notwendig sind, betreffen die Aufklärung des Wirkungsmechanismus embryotoxischer Substanzen. Mit Hilfe der erarbeiteten Methoden sind jetzt Stoffwechseluntersuchungen unter dem Einfluß von Pharmaka am embryonalen Gewebe in-vivo und in-vitro möglich. Auch solche Untersuchungen haben wir bereits mit einer Reihe von Pharmaka begonnen.

Die in-vitro-Versuche haben gezeigt, daß es möglich ist, die nucleinsäure- und proteinsynthetisierenden Systeme auch an isolierten Embryonen über einen verhältnismäßig langen Zeitraum zu untersuchen. Da die spezielle Eigenheit des embryonalen Gewebes darin besteht, daß ein Wachstum - d.h. eine Vermehrung von Protein, RNA, DNA und Zellzahl - innerhalb eines Zeitraumes von wenigen Stunden meßbar ist und weiterhin auch Differenzierungsvorgänge, wie z.B. die Bildung von Organanlagen und speziellen Geweben mit spezifischer Enzymausstattung ebenfalls in verhältnismäßig kurzen Zeiträumen verfolgt werden können, bietet eine in-vitro-Versuchsanordnung die Möglichkeit, die Beziehungen zwischen dem Nucleinsäurestoffwechsel und diesen Wachstums- und Differenzierungsvorgängen zu untersuchen. Auch für derartige Untersuchungen sollte die vorliegende Arbeit die Grundlage schaffen.

Eng verbunden mit der Frage des Wachstums von bestimmten Geweben ist auch das Problem der Biogenese bestimmter Zellorganellen. Bei einer Vervielfachung der Masse des Embryo und der Zellzahl innerhalb von 24 Stunden muß auch die Zahl der Zellorganellen wie Mitochondrien, Mikrosomen usw., sich vervielfachen. Damit stellt das embryonale Gewebe ein ideales Modell auch zur Bearbeitung dieser Problemstellung dar.

Es ist weiterhin von großem Interesse, den Einfluß embryotoxischer Substanzen auf den embryonalen Zellstoffwechsel in vivo zu untersuchen. Selbstverständlich ist es naheliegend, derartige Untersuchungen mit Hilfe von radioaktiv markierten Vorstufen durchzuführen. Leider sind solche Untersuchungen dadurch kompliziert, daß viele der

gebräuchlichen Vorstufen nicht leicht in den Embryo übertreten. Es sollte daher ein weiteres Anliegen dieser Arbeit sein, nach Methoden zu suchen, die es gestatten, Screening-Tests aufzubauen, mit deren Hilfe der Einfluß von embryotoxischen Substanzen auf embryonale Stoffwechselwege einmal in-vivo getestet werden kann, zum anderen aber auch in-vitro unter der Einwirkung definierter Konzentrationen embryotoxischer Substanzen Stoffwechselfunktionen untersucht werden können.

Wir glauben, daß es möglich ist, die Doppelmarkierungstechnik mit C^{14}-Glucose und P^{32} für einen solchen Zweck zu verwenden. Der Vorteil der Glucose liegt offenbar darin, daß sie verhältnismäßig leicht auf den Embryo übergeht und in eine Vielzahl verschiedener Zellbestandteile eingebaut wird (s. Abbildung 38). Alle säureunlöslichen Hauptbestandteile der Zelle wie Nucleinsäuren, Lipide und Proteine werden nach intravenöser Gabe von C^{14}-Glucose in einem solchen Ausmaß radioaktiv markiert, daß eine Messung der spezifischen Aktivität gut möglich ist. Ein Screening-Testsystem kann so aufgebaut werden, daß von jedem Muttertier eine bestimmte Zeit nach der intravenösen Injektion 3 Untersuchungen durchgeführt werden:

1. eine Bestimmung der Radioaktivität im Blut,
2. von einer Anzahl von Embryonen eine Aufschlüsselung der Radioaktivität nach dem Säure-Laugen-Extraktions-Verfahren,
3. eine Phenol-Extraktion des Restes der Embryonen.

Die Bestimmung der Radioaktivität im Blut gestattet eine Kontrolle darüber, ob die Injektion lege artis durchgeführt wurde, oder ob grobe Stoffwechselveränderungen bei dem Muttertier vorliegen. Die Bestimmung der Gesamtradioaktivität in säurelöslicher und säureunlöslicher Fraktion erlaubt eine Aussage über den Übertritt der Radioaktivität auf den Embryo und einen Vergleich mit entsprechenden Kontrollwerten. Die Messung der spezifischen Aktivität in der Lipidfraktion, RNA-Fraktion und DNA-Fraktion gestattet Rückschlüsse auf die Vielzahl der Reaktionen, die für eine Markierung dieser Komponenten notwendig sind. Durch Bestimmung der spezifischen Aktivität in den verschiedenen Bausteinen einer RNA-Komponente - z.B. der ribosomalen RNA - nach Phenolextraktion, Isolierung der RNA-Komponente, Hydrolyse und Auftrennung kann eine große Zahl weiterer Stoffwechselwege beurteilt werden, da eine getrennte Messung der de novo-Synthese von Purinen und Pyrimidinen und den Verknüpfungen der entsprechenden neugebildeten Basen mit den Ribose- und Phosphat-Komponenten möglich wird. Es bietet keine besonderen Schwierigkeiten, diese Untersuchungen auch auf die Zellkern-DNA auszudehnen und damit noch zusätzlich die

Umwandlung von Ribonucleotiden in Deoxy-Ribonucleotide zu erfassen. Die Möglichkeit eines solchen Vorgehens wurde bereits auf dem IV. Internationalen Pharmakologen-Kongreß in Basel diskutiert.

Selbstverständlich stellt ein solcher Screening-Test noch lange kein befriedigendes Testsystem zur Aufdeckung und zum Ausschluß embryotoxischer Substanzen dar. Er kann nur Anhaltspunkte darüber ergeben, ob bei der betreffenden Spezies - unsere Untersuchungen wurden bisher alle mit Ratten durchgeführt, es ist prinzipiell aber durchaus möglich, den Test auch an anderen Tierspezies vorzunehmen - eine Stoffwechselstörung in den von dem Test erfaßten Stoffwechselwegen auftritt. Der Vorteil des In-vivo-Testsystems besteht darin, daß auch die Wirkung von Metaboliten mit erfaßt wird. Wenn ein Anhalt für eine bestimmte Stoffwechselstörung erbracht wird, kann der betreffende Stoffwechselweg näher untersucht werden. Man sollte erwarten, daß ein derartiger biochemischer Test sehr viel empfindlicher reagiert, als die bisher praktisch ausschließlich verwandten rein morphologischen Screening-Methoden.

Der von uns vorgeschlagene Test kann natürlich nur Stoffwechselstörungen aufdecken, die bei der entsprechenden Tierspezies auftreten. Dies wirft einen wesentlichen Punkt der teratologischen Forschung auf. Es ist nicht zu erwarten, daß beispielsweise mit diesem Screening-Test, wenn er an Ratten durchgeführt wird, eine embryotoxische Wirkung von Thalidomid gefunden wird. Die Beurteilung der Frage, ob daher grundsätzlich alle theoretischen Untersuchungen am Affen durchgeführt werden müssen - was dann auch für die biochemischen Untersuchungen gelten müßte - übersteigt den Rahmen dieser Arbeit. Falls diese Frage jedoch prinzipiell zu bejahen ist, sind biochemische Untersuchungen am Affen genauso möglich wie morphologische.

D) Zusammenfassung

1.)
Es wurden Methoden ausgearbeitet, die es gestatten sollten, den Einbau radioaktiv markierter Vorstufen in bestimmte Zellbestandteile von Säugetierembryonen zu verfolgen. Da der Nucleinsäurestoffwechsel in diesem Zusammenhang besonders interessierte, wurde besonderer Wert auf die Ausarbeitung von Methoden gelegt, die eine Messung des Nucleinsäurestoffwechsels gestatten.

2.)
Es ist möglich, aus embryonalem Gewebe von Ratten am Tag 11 bis 15 der Schwangerschaft Nucleinsäuren zu isolieren, die verschiedenen RNA-Komponenten im Saccharose-Gradienten aufzutrennen und die radioaktive Markierung nach Hydrolyse der entsprechenden RNA-Komponenten in den verschiedenen Bausteinen der Nucleinsäure zu bestimmen.

3.)
Neben der Phenol-Extraktion und anschließender Isolierung der RNA wurde eine Säuren-Laugen-Extraktions-Methode den besonderen Bedürfnissen des embryonalen Gewebes angepaßt. Mit dieser Methode ist es möglich, den Einbau einer radioaktiv markierten Vorstufe in säurelösliche und säureunlösliche Komponenten des embryonalen Gewebes zu verfolgen. Die spezifische Aktivität in der RNA, in Lipiden, der DNA und in Proteinen kann gemessen werden.

4.)
Nach einer Injektion von 1 mCi/kg intravenös wurde der Einbau in Nucleinsäuren, Lipide und Proteine im embryonalen Gewebe und in der Leber bestimmt. Nach Injektion von Orotsäure, Bicarbonat und Uracil kommt es beim Embryo nur zu einer sehr geringen Markierung in den Nucleinsäuren. Die Aminosäure Asparaginsäure und Glycin eignen sich nur bedingt, Formiat, Uridin, Glucose und P^{32} aber sehr gut zur Markierung embryonaler Nucleinsäuren.

5.)
Nach Injektion von C^{14}-Glucose und P^{32} sind beide Komponenten der ribosomalen RNA 1,5 Stunden nach der Injektion radioaktiv markiert. Die Markierung nimmt bis zu einem Zeitraum von 10 Stunden kontinuierlich zu. Man erhält weder mit P^{32} noch mit C^{14}-Glucose eine echte Pulsmarkierung, so daß ein Umsatz von ribosomaler RNA mit diesen Vorstufen nicht gemessen werden kann.

6.)
Ein besonders hoher Einbau von C^{14}-Glucose und P^{32} wird bei 11 Tage alten Embryonen gemessen. Die Einbaurate nimmt mit zunehmendem Alter der Embryonen ab und erreicht bei 15 Tage alten Embryonen etwa Werte, wie sie bei der Leber des Muttertieres gemessen werden.

7.)
Nach Markierung mit P^{32} und C^{14}-Glucose (Doppelmarkierung) wurde die Radioaktivität in den Mononucleotiden der ribosomalen RNA ermittelt. Die Einbaurate der Nuclide nimmt über 5 Stunden recht gleichmäßig zu.

8.)
Untersuchungen der Markierungsrate der Basen haben gezeigt, daß nach Markierung mit C^{14}-Glucose schon nach der relativ kurzen Zeit von 3 Stunden eine deutliche Radioaktivität in allen 4 Basen der 28 S RNA nachweisbar ist. Nach 10 Stunden ist die Markierungsrate viel höher.

9.)
Zur besseren Beurteilung der Placentarbarriere wurden in-vitro-Systeme entwickelt. Für Kurzzeitversuche dienten reine elektrolythaltige Lösungen, für Inkubationen über längere Zeit (im Bereich 3 - 5 Stunden) dienten serumhaltige Lösungen; in den Trowel-Kulturen konnten Embryonen mehr als 24 Stunden am Leben erhalten werden.

10.)
Es wurde festgestellt, daß die Aufnahme von radioaktiver Glucose und P^{32} in serumhaltigen "submers"-Kulturen über Stunden linear verläuft. Auch die prozentuale Verteilung der Markierung ändert sich in Abhängigkeit zur Zeit kaum.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) ANDERSON, N.G. : Zonal Centrifuges and Other Separation Systems
in: Science 154, 1966, p. 103

(2) BAYLY, R.J., EVANS, E.A. : Storage and Stability of Compounds Labelled with Radioisotopes, March 1968, The Radiochemical Center Amersham,Bucks, England, Review 7

(3) BERNFIELD, P., NISSELBAUM, J.S., BERKELEY, B.J., HANSON, R.W. :
The Influence of Chemical and Physiochemical Nature of Macromolecular Polyanions on their Interaction with Human Serum ß-Lipoproteins
in: J.B.C. 235 IV, 1960, p. 2852

(4) BISHOP, D.H.L., CLAYBROOK,J.R., SPIEGELMAN, S.J. : Electrophoretic Separation of Viral Nucleic Acids on Polyacrylamide Gels
in: J.M.B. 26, 1967, p. 373

(5) BOMAN,H.G. : "Molecular Sieving" of Bacterial RNA
in: Archiv Biochem. Biophys. 1, Supplement 1, 1962, p. 276

(6) BRADLEY, D.F.,RICH, A. : The Fractionation of Ribonucleic Acids on ECTEOLA-Cellulose Anion Exchangers,
in: J. American Chem. Soc. 78, 1956, p. 5898

(7) BRAKKE, M.K. : Zonal Separation by Density Gradient Centrifugation
in: Archive Biochem. Biophys. 45, 1953, p. 275

(8) BRAKKE, M.K. : Density Gradient Centrifugation. A New Separation Technique
in: J. Am. Chem. Soc. 73, 1951, p. 1847

(9) BRAY, A.G. : A Simple Efficient Liquid Scintillator for Counting Aquons Solutions in Liquid Scintillation Counter
in: Anal. Biochem. 1 N° 4-5, 1960, p. 279-1285

(10) BRITTEN, R.J., ROBERTS,R.B. : High-Resolution Density Gradient Sedimentation Analysis
in: Nature 131,1960, p. 32

(11) BROWN, D.D., DAVID, J.B. : Specific Gene Amplification in Oocytes, Oocyte nuclei contain extrachromosomal replicas of the genes for ribosomal RNA
in: Science 160, 1968, p. 272

(12) BROWN , NEWMAN , STUART : Chromatographie of Infective Ribonucleic Acid from Foot-and-mouth Desease Virus on Calcium Phosphate
in: Nature 197, 1963, p. 590

(13) BRUNS, G.P., FISCBER, S., LOWY, B.A. : A Study of the Synthesis and Interrelationships of RNAs in Duck Erythrocytes
in: BBA 95, 1965, p. 280

(14) BURTON, K. : A study of the conditions and mechanism of the reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid
in: Biochem. J., 62, 1956, p. 315-323

(15) Mc CARTHY, STAFFORD, BROWN : Resolution and Fractionation of Macromolecules by Isokinetic Sucrose Density Gradient Sedimentation
in: Analytical Biochemisty 24, 1968, p. 314-329

(16) CARTOUZOU,G., MANTÉ,S. , LISSITTZKY, S. :Purification and some Properties of Sheep Thyreoid and Rat Liver Messenger RNAs
in: Biochem Biophys. Res. Comm. 20, 1965, p. 212

(17) CHARGAFF, DAVIDSON : The Nucleic Acids I, Chapter 14 :
BEAVEN,G.H., HOLIDAY, E.R., JOHNSON,E.R. : Optical Properties of Nucleic Acids and Their Components; Academic Press Inc., Publishers N.Y., 1955

(18) CHARGAFF,E., ZAMENHOF,S. : The Isolation of highly polymerized Desoxypentosenucleic Acid from Yeast Cells
in: J.B.C. 173, 1948, p. 327

(19) CLICK, R. : Electrophoretic Separation of mononucleotides from an alkaline hydrolysate of RNA
in: BBA 129, 1966,p. 424-426

(20) CLICK, R.E., HACKETT, D.P. : The Isolation of Ribonucleic Acid from Plant, Bacterial or Animal Cells
in: BBA 129, 1966, p74

(21) COOLSMA, J.W.TH., GRUBER, M.C. : RNA-Synthesis in Rooster Liver
in: BBA 169, 1968, p. 306

(22) DAVIDSON, J.N., FRAZER,S.C., HUTCHINSON, W.A. : Phosphorus compounds in the cell
in: Biochem. J. 49, 1951, p. 311-21

(23) DAVIDSON, J.N., SMELLIE, R.M.S. : Phosphorus Compounds in the Cell; The Separation by Ionophoresis on Paper of the constituent Nucleotides of Ribonucleic Acids
in: Biochem. J. 52, 1952, p. 594

(24) DAVIDSON, J.N. : The Biochemistry of the Nucleic Acids; London: Methuen and Co Ltd, New York: John Wiley and Sons,Inc., 5th Edition, 1965

(25) DE DEKEN-GRENSON, M. , DE DEKEN, R.H. : Elimination of substances interfering with nucleic acid estimation
in: BBA 31, 1959, p. 195-207

(26) DI GIROLAMO,A. , HENSHAW,E.C. , HIATT, H.H.: Messenger Ribonucleic Acid in Rat Liver Nuclei and Cytoplasm
in: J. Mol. Biol. 8, 1964, p. 479

(27) DINGMAN, W. , SPOM, M.B. : The Isolation and Physical Characterisation of Nuclear and Microsomal RNA from Rat Brain and Liver
in: BBA 61, 1962, p. 164

(28) DÜTTING,D. , FELDMANN, H. , ZACHAU, H.G. : Partial Digestion of Serine Transfer Ribonucleic Acids with Pancreatic and T_1 Ribonucleases
in: Hoppe Seyler 347, 1966, p. 249

(29) FLOYD, L. , OKAMURA, N. , BUSCH, H. : Base Composition of Rapidly Sedimenting nuclear RNA of the Regenerating Liver
in: BBA 129, 1966, p. 68-73

(30) FOX, J.J. , SHUGAR, D. : Spectrophotometric Studies of Nucleic Acid Derivatives and Related Compounds as a Function of PH
in: BBA 9, 1952, p. 369

(31) GEORGIEV, G.P. , SAMARINA, O.P. , LERMAN, J. M. , SMIRNOV, M.N. , SEVERTZOV, A.N. : Biosynthesis of Messnger and Ribosomal Ribonucleic Acids in the Nucleolochrosomal Apparatus of Animal Cells
in: Nature 200, 1963, p. 1291-94

(32) GEORGIEV, G.P. , LERMAN, M.J. : Separation and some Properties of Distinct Classes of Newly-formed Ribonucleic Acid from Animal Cells
in: BBA 91, 1964, p. 678-680

(33) GOULD, H. : A comparison of specific fragments produced by partical digestion of reticulocyte ribosomal RNA with pancreatic and T_1 ribonuclease
in: BBA 123, 1966, p. 441

(34) GOULD, H. : The Specific Cleavage of Ribonucleic Acid from Reticulocyte Ribosomal Subunits
in: Biochemistry 5, 1966, p. 1103

(35) GOLDWAIT, D. : Isolation and characterization of Ribonucleic Acid Fractions from Rat Liver
in: J.B.C. 234 IV, 1959, p. 3245

(36) GROS, F. , GILBERT, W. , HIATT, H. et al. : Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling of E. coli
in: Natur 190, 1961, p. 581

(37) HADGIVASSILIOU, A.G. , BRAWERMAN, G. : Template and "DNA-like" Ribonucleic Acids as Distinct Entities in a Preparation from Rat Liver
in: BBA 103, 1965, p. 211

(38) HALL, B.D. , DOTY, P. : The Preparation and Physical Chemical Properties of RNA from Microsomal Particels
in: J.M.B. 1, 1959, p. 111-126

(39) HORECKER, B.L. : Carbohydrate Metabolism and its Disorders; Chapter 5: Pentose Phosphate Pathway, Uronic Acid Pathway, Interconversion of Sugars; Academic Press London, Vol. 1,1968

(40) HUTCHINSON, W.C. , MUNROE, H.N. : The Determination of Nucleic Acids in Biological Materials
in: Analyst 86, 1961,p. 768-813

(41) ITZHAKI, S. : Metabolic studies on the Sugars of Nucleic Acids;
I The isolation of pyrimidine-bound sugars and utilisation of ($^{14}C_6$)-Glucose for ribose formation in mammalian tissues in vitro
in: BBA 87, 1964, p. 541-553

(42) ITZHAKI, S. , WHITTLE, E.D. : Metabolic Studies on the Sugars of Nucleic Acids;
II Comparison with P^{-32} incorporation into ribonucleic acid and Deoxyribonucleic acid of rat thymus-cells
in: BBA 87, 1964, p. 554-563

(43) KAUFMAN, M. , PHILIPSON, L. : The efficiency of RNase inhibitors tested with viral RNA as substrate
in: BBA 80, 1964, p. 154-157

(44) KIRBY, K.S. : A new methode for the isolation of DNAs: Evidence on the Nature of Bounds between DNA and Proteins
in: Biochem. J. 66, 1957, p. 495

(45) KIRBY, K.S. : The Preparation of Deoxyribonucleic Acids by the p-Aminosalicylate-Phenol Method
in: BBA 36, 1959, p. 117

(46) KIRBY, K.S. : A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues
in: Biochem. J. 64, 1956, p. 405-408

(47) KIRBY, K.S. : Isolation and Characterization of Ribonucleic Acid
in: Biochem. J. 96, 1965, p. 266

(48)KIRBY, K.S. , COOK, E.A. : Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Mammalian Tissues
in: Biochem. J. 104, 1967, p. 254

(49) LANG, N. , SEKERIS, C.E. : Isolation from Rat Liver Cells of a Nuclear RNA Fraction Having Messenger Activity
in: Life Sciences 3, 1964, p. 161-67

(50) LASKOV, R. , MARGOLIASH, E. , LITTAUER, U.Z. , EISENBERG, H. : High-Molecular-Weight Ribonucleic Acid from Rat Liver
in: BBA 33, 1959, p. 247

(51) LIAO, S.: Influence of Testosterone on Template Activity of Prostatic Ribonucleic Acids
in: J. Biol. Chem. 240, 1965, p. 1236

(52) LOEB, H.G. , DICKINSON, E. : Observation on animal nucleic acid,analysis with the Ogur-Rosen procedure
in: Archiv. Biochem. Biophys. 57, 1955, p. 515-517

(53) LOEB, L.A. , GELBOIN, H.V. : Influence of Testosterone and Polyuridylic Acid on the Incorporation of Phenylalanin into Peptide Linkage by Prostatic Ribosomes
in: Nature 199, 1963, p. 809

(54) LOENING, U.E. : The Fractionation of High-Molecular-Weight Ribonucleic Acid by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis
in: Biochem. J. 102, 1967, 251

(55)MAHLER, U. , MOORE, W.J. , THOMPSON, R.J. : Isolation and characterization of RNA from Cerebral Cortex of Rat
in: J.B.C. 241,1966, p. 1283

(56) MANDELL, J.D. , HERSHEY, A.D. : A Fractionating Column for Analysis of Nucleic Acids
in: Anal. Biochem. 1, 1960, p. 66

(57) MARKHAM, R. , SMITH, J.D. : Structure of Ribonucleic Acid
in: Nature 168, 1951, p. 406

(58) MARKHAM, R. , SMITH, J.D.: Chromotographic Studies on Nucleic Acids; 4.) The Nucleic Acid of the Turnip Yellow Mosaic Virus,including a Note on the Nucleic Acid of the Tomato Bushy Stunt Virus
in: Biochem. J. 49, 1951, p. 401

(59) MARKHAM, R. , SMITH, J.D. : Chromatographic Studies on Nucleic Acids; 1.) A Technique for the Identification and Estimation of Purine and Pyrimidine Bases, Nucleotides and Related Substances
in: Biochem. J. 45, 1949, p. 294

(60) MARKO, A.M. , BUTLER, G.C. : The Isolation of Sodium Deoxyribonucleate with Sodium Dodecylsulfate (SDS)
in: J.B.C. 190, 1951, p. 165

(61) MARSHAK, A. , VOGEL, H.J. : Microditermination of Purines und Pyrimidines in Biological Material
in: J.B.C. 189, 1950, p. 597

(62) MARSHAK, A. , VOGEL, H.J. : Quantitative micro-analysis of nucleic acid purines and pyrimidines without prior isolation of the nucleic acids
in: Federation Proceedings 9, 1950, p. 85-86

(63) MARSHAK, A. , MARSHAK, C. : Quantitative Determination of DNA in Echinoderm Germ Cells
in: Exp. Cell. Res. 8,1955, p. 126

(64) MARRIAN, D.H. , SPICER, K.L. , BALIS, M. E.,BROWN, G.B. : Purine-Incorporation into Pentose Nucleotides of the Rat
in: J.B.C. 189, 1951, p. 533

(65) MARTIN , AMES : A Methode for Determining the Sedimentation Behavior of Enzymes: Application to Protein Mixtures
in: J.B.C. 236, 1961, p. 1372

(66) MC EWEN. C.R. : Tables for Estimating Sedimentation through Linear Concentration Gradients of Sucrose Solution
in: Analyth. Biochem. 20, 1967, p. 114

(67) MC PHIE, P. , HOUNSELL, J. , GRATZER, W.B. : The Specific Cleavage of Yeast Ribosomal RNA with nucleases
in: Biochemistry 5, 1966, p. 988

(68) MIZUNO, N.S. , COLLIN, M.V. , HOF, H. : Factors affecting quantitation of RNA fractions by use Phenol and thermal gradient
in: BBA 149, 1967, p. 296-298

(69) MÖLLER, W. , BOEDTKER : Acides ribonucleiques et polyphosphates
in: Colloques Internationaux CNRS N° 106 Paris

(70) MOULÉ, Y. : Étude des acides nucléiques et de certains dérives organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux
in: Arch. Sci. Physiolog. 7, 1953,p. 161

(71) NEUBERT, D. , SCHAEFER, J. , STEIN, F. : Eigenwirkungen radioaktiven Phosphates auf oxydative Leistunfen von Mitochondrien und Mikrosomen der Rattenleber
in: Naunyn Schmiedebergs Archiv exp. Path. und Pharmak. 239, 1960, p. 245

(71a) NEUBERT, D. , KÖHLER, E. : Comparative Studies on Nucleic Acid Metabolism During Mammalian Embryonie Development and During Proliferation of Other Tissues Induced by Hormons or Drugs
bei: Fourth International Congress on Pharmacology in Bale 1969

(72) NOLL, H. : Characterization of Macromolecules by Constant Velocity Sedimentation
in: Nature 215, 1967, p. 360-63

(73) NOMURA, HALL , SPIEGELMANN: Characterization of RNA Synthesized in E. coli after Bacteriophage T_2 Infection
in: J.M.B. 2, 1960, p. 306

(74) OGUR, M. , ROSEN , G. : The nucleic acids of plant tissue; I The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid
in: Archiv. Biochem. 25, 1950, p. 262

(75) PENMAN, S. : RNA Metabolism in the Hela Cell Nucleus
in: J.M.B. 17, 1966, p. 117

(76) PLOESER, J.M. , LORING, H.S. : The Ultraviolet Absorption Spectra of the Pyrimidine Ribonucleosides and Ribonucleotides
in: J.B.C. 178, 1949, p. 431

(77) RALPH, R.K. , BELLAMY, A.R. : Isolation and Purification of undegrade RNA
in: BBA 87, 1964, p. 9-16

(78) RICHARDS, E.G. , COLL , J.A. , GRATZER, W.B. : Disc Electrophoresis of Ribonucleic Acid in Polyacrylamide Gels
in: Anal. Biochem. 12, 1965, p. 452

(79) RICHARDS, E.G. , GRATZER, W.B. : An investigation of Soluble Ribonucleic Acid by Zone Electrophoresis
in: Nature 204, 1964, p. 878

(80) RISTOW , KÖHLER : Messenger RNA associated with polysoms,ribosomen and subribosomal particles in KB cells
in: BBA 142, 1967, p. 65

(81) SACKS, J. , HURLEY, P. , YOUNG, J.M.jr. : The Metabolic inhomogenity of ribonucleic acid phosphorus
in: J.B.C. 214, 1955, p. 723

(82) SAMARINA, O.P. , LUKANIDIN, E.M. , MOLNAR, J. , GEORGIEV, G.P. : Structural Organization of Nuclear Complexes Containing DNA-like RNA
in: J. Mol. Biol. 33, 1968, p. 251-63

(83) SAMARINA, O.P. , KRICHEVSKAYA, A.A. , GEORGIEV, G.P. : Nuclear Ribonucleoprotein Particles Containing Messenger Ribonucleic Acid
in: Nature 210, 1966, p. 1319-22

(84) SCHERRER, K. , DARNELL, J.E. : Sedimentation Characteristic of Rapidly Labelled RNA from Hela Cells
In: BBRC 7, 1962, p. 486

(85) SCHERRER, K. , LATHAM, H. , DARNELL, J.E. : Demonstration of an Unstable RNA of a Precursor to Ribosomal RNA in Hela Cells
in: PNAS 49, 1963, p. 240

(86) SCHMIDT, G. , THANNHAUSER, S.J. : A methode for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues
in: J.B.C. 161, 1945, p. 83-89

(87) SCHNEIDER, W. : Phosphorus compounds in animal tissues; I Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid
in: J.B.C. 161, 1945, p. 293-303

(88) SCHÜTZ, G. , GALLWITZ, D. , SEKERIS, C.E. : Rapidly Labelled High Molecular RNA from Rat Liver
in: Europ. J. Biochem. 4, 1968, p. 149-56

(89) SCHUSTER, H. , SCHRAMM, G. , ZILLIG, W. : Die Struktur der Ribonukleinsäure aus Tabakmosaikvirus
in: Zeitschrift f. Naturforschung 11b, 1956, p. 339

(90) SHACK, J. , JENKINS, THOMPSETT : The Interaction of Ions and Deoxypentose Nucleic Acid of Calf Thymus
in: J.B.C. 203, 1953, p. 373

(91) SHUGAR, D. , FOX, J.J. : Spectrophotometric Studies of Nuclear Acid Derivatives and Related Compounds as a Function of PH
in: B.B.A. 9, 1952, p. 199

(92) SIBATANI, A. , DE KLOET, S.R. , ALLFREY, V.G, , MIRSKY, A.E. : Isolation of a Nuclear RNA Fraction Resembling DNA in its Base Composition
in: Proc. Nat. Acad. Sci. US 48, 1962, p. 471

(93) SIBATANI, A. , YAMANE, K. , KIMURA, K. , OGASAKI, H. : Fractionation with Phenol of ribonucleic acid of animal cells
in: BBA 33, 1959, p. 590

(94) SMILLIE, R,M. , KROTKOV ,G. : The estimation of nucleic acids in some algue,higher plants
in: Canad. J. of Botany 38, 1960, p. 31-49

(95) SMITH, J.D. , MARKHAM ,R. : Chromatographie studies on nucleic acids; 2.) Quantitatives analysis of ribonucleic acid
in: Biochem. J. 46, 1950, p. 509-513

(96) SOLOMON, J.B. : Nucleic Acid Content of Early Chick Embryos and the Hen's Egg
in: BBA 24, 1957, p. 584

(97) STANSLEY, P.G. , CHU, M.W. : Concerning Acid Extraction of Cytoplasmic RNA
in: Exp. Cell Res. 20, 1960, p. 206

(98) STEINERT ,M. : La synthèse de l' acide ribonucléique au cours du développement embryonnaive des batraciens
in: Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 33, 1951, p. 549

(99) SUEOKA, N. , CHENG : Fractionation of Nucleic Acids with the Methylated Albumin Column
in: J.M.B. 4, 1962, p. 161

(100) SUEOKA, N. , YAMANE, T. : Fractionation of Amino Acyl-Acceptor RNA on a Methylated Albumin Column
in: Proc. Nat. Acad. Sci. 48,1962, p. 1454

(101) TROWEL : The Culture of Nature Organs in a Synthetic Medium
in: Exper. Cell Research 16, 1959, p. 118-147

(102) TYNER, E.P. , HEIDELBERGER, C. , LE PAGE, G.A. : Intracellular Distribution of Radioactivity in Nucleic Acid
in: Cancer Research 13, 1953, p. 186

(103) VISCHER, E. , CHARGAFF, E. : The Composition of the Pentose Nucleic Acids of Yeast and Pankreas
in: J.B.C. 176, 1948, p. 715

(104) WEINBERG, R. , LOEMING, U. , WILLEMS, M. , PENMAN, S.: Acrylamide Gel Electrophoresis of Hela Nucleolar RNA
in: PNAS 58, 1967, p. 1088

(105) WESTPHAL, O. , LÜDERITZ, D. , BISTER, F. :Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser
in: Zeitschrift für Naturforschung 7b, 1952,p. 148

(106) WILKINSON, B.R. , KIRBY, K.S. : Rapidly Labelled Ribonucleic Acid from Rat Liver;
in: Biochem. J. 99, 1966, p. 786

(107) WILLSON , C. , GROS, E. : An RNA Fraction in Human Placenta with Template Activity
in: B.B.A 119, 1964, p. 407

(108) ZACHAU, H.G. : Reaktionsfähige Aminosäureester als Modelle der Aminoacyl-ribonukleinsäure
in: Chem. Berichte 93, 1960, p. 1822

Abkürzungsverzeichnis der Zeitschriften

B B A	= Biochem. Biophys. Acta
J B C	= Journ. Biol. Chem.
J M B	= Journ. Mol. Biol.
BBRC	= Biochem. Biophys. Research Comm.
PNAS	= Proc. Nat. Acad. Sci. US

RALF KROWKE
1 Berlin - 19
Eichenallee 64

LEBENSLAUF

Geburtsdatum:	15. Mai 1940 in Berlin
Vater:	Hans Günther Krowke (Apotheker)
Mutter:	Ilse Krowke, geb. Kannenberg
April 1945	Flucht nach Flensburg
April 1947 - 50	Besuch der Volksschule in Flensburg
1950 - 54	Besuch des Gymnasiums in Flensburg
April 1954 -60	Besuch der Dahlmannschule in Bad Segeberg
1958	Tod des Vaters
März 1960	Abitur
April 1960 - März 1962	Praktikum als Apothekerpraktikant in der Mommsen-Apotheke in Berlin
April 1962 - März 1963	Vertretungen in verschiedenen Apotheken
SS 1963 - WS 1963/64	Pharmaziestudium an der TU-Berlin
SS 1964 - WS 1965/66	Pharmaziestudium an der FU
April 1966	Staatsexamen
Mai 1966 - Oktober 1966	Kandidatenzeit in der Apotheke
September 1966	Heirat
Oktober 1966 - Januar 1970	Doktorand im Pharmakologischen Institut der FU-Berlin

difo-druck schmacht · bamberg